



**UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**“AISLAMIENTO DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS PRESENTES
EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL SECTOR SAN PEDRO DE
YUMATE, MOLLETURO, AZUAY, ECUADOR.”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AMBIENTAL**

AUTORES:

BLANCA CLAUDINA LEÓN CHUÑIR
C.I. 0104232392
SANTIAGO ADRIÁN ROMERO JIMÉNEZ
C.I. 0302058680

DIRECTORA:

BLGA. MARÍA ELISA DURÁN LÓPEZ, MSc.
C.I. 0104249958

ASESORES:

BQF. MÓNICA ALEXANDRA NARVÁEZ VERA.
C.I. 0104715297

**CUENCA- ECUADOR
2017**

RESUMEN

En el Ecuador, los estudios relacionados al papel que cumplen los hongos micorrízicos en las orquídeas han sido escasos. Estos hongos micorrízicos desempeñan un rol de vital importancia, permitiendo la germinación, nutrición y desarrollo de la familia Orchidaceae. Es posible aislar alguno de estos hongos micorrízicos por medio de la extracción de las raíces de las orquídeas. Este trabajo se centró en aislar los hongos; para este propósito se recolectaron los fragmentos de raíces jóvenes de orquídeas nativas en los meses de Octubre y Diciembre de 2016, en la comunidad San Pedro de Yumate a una altitud entre los 3000 - 3100 m.s.n.m, para posteriormente aislar e identificar hongos potencialmente micorrízicos presentes en las diferentes secciones basal, media y apical de las raíces de las especies: *Pleurothallis* sp, *Edipendrum* (2 especies), *Odontoglossum hallii*, *Cyrtochilum macranthum* y *Odontoglossum pardinum*. Se recolectaron 20 fragmentos de raíces jóvenes por especie y se sembraron en medio de cultivo Fungi Insolation Medium (FIM), obteniéndose 60 fragmentos que corresponden a las diferentes secciones de la raíz (basal, media, apical). Posteriormente se procedió a realizar el replante en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA), lográndose aislar 28 colonias de hongos que probablemente pertenecen a los géneros *Tulasnella* y *Ceratobasidium*, por sus características morfológicas. Los hongos aislados serán identificados por medio de análisis sistemático molecular, correspondiente a la segunda fase dentro del proyecto (*Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador*) financiado por la DIUC.

PALABRAS CLAVES: Orquídeas, micorrizas, *Rhizoctonia*, aislamiento, fragmentos, medio de cultivo.

ABSTRACT

In Ecuador, studies related to the role of mycorrhizal fungi in orchids have been scarce. These mycorrhizal fungi play a vital role, allowing the germination, nutrition and development of the family Orchidaceae. It is possible to isolate some of these mycorrhizal fungi by extracting the roots of the orchids. This work focused on isolating fungi; For this purpose the fragments of young roots of native orchids were collected in the months of October and December 2016 in the San Pedro de Yumate community at an altitude between 3000 - 3100 m.a.s.l, to later isolate and identify potentially mycorrhizal fungi present in the different basal, medium and apical roots of the species: *Pleurothallis* sp, *Edipendrum* (2 species), *Odontoglossum* hallii, *Cyrtorchilum macranthum* and *Odontoglossum pardinum*. Twenty young root fragments were harvested per species and seeded in Fungi Insolation Medium (FIM) culture medium, obtaining 60 fragments corresponding to the different sections of the root (basal, medial, apical). Subsequently, the replanting was carried out in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium, being able to isolate 28 colonies of fungi that probably belong to the genera *Tulasnella* and *Ceratobasidium*, due to their morphological characteristics. The isolated fungi will be identified by systematic molecular analysis, corresponding to the second phase in the project "*Study of the symbiotic relationship orchid-mycorrhiza in the province of Azuay, Ecuador*" funded by the DIUC.

KEYWORDS: Orchids, mycorrhizae, *Rhizoctonia*, isolation, fragments, culture medium.



TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	18
1. ORQUÍDEAS.....	18
1.1. Generalidades de las orquídeas.....	18
1.2. Importancia de las Orquídeas.	18
1.3. Importancia de orquídeas nativas del Ecuador.....	19
1.4. Taxonomía.....	19
1.5. Hábitat	20
1.6. Características generales de las orquídeas.....	20
1.6.1. Tipo de crecimiento.....	20
1.6.2. Ciclo vegetativo.....	21
1.7. Descripción de las orquídeas utilizadas en la investigación.....	23
1.7.1. Género: <i>Odontoglossum</i>	23
1.7.2. Género: <i>Oncidium</i>	24
1.7.3. Género: <i>Epidendrum</i>	25
1.7.4. Género: <i>Pleurothallis</i> sp.	26
2. MICORRIZAS.....	26
2.1. Asociaciones micorrízicas.	26
2.2. Importancia de las micorrizas.....	27
2.3. Clases de micorrizas	27
2.4. Factores ecológicos relacionados a la micorrización.	28
2.5. Micorrizas de orquídeas	29
2.6. Géneros simbiotes orquidioides	29
2.6.1. Identificación de género- forma <i>Rhizoctonia</i>	29
2.6.2. Morfología de <i>Rhizoctonia</i>	29
CAPÍTULO II	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Área de estudio.....	31
3.2. Métodos.	33



3.2.1.	Recolección de raíces de orquídeas epífitas	33
3.3.	Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos.	33
3.3.1.	Cultivos in vitro para la germinación de orquídeas.	33
3.3.2.	Preparación y siembra de la raíz de la orquídea en el medio FIM.	34
3.3.3.	Observación de pelotones en el medio FIM.	36
3.3.4.	Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos en el medio PDA. ...	36
3.3.5.	Microcultivo	38
3.3.6.	Prueba de identificación de hongos contaminados.....	39
3.4.	Identificación macroscópica y microscópica de hongos.....	39
3.4.1.	Características macroscópicas evaluadas.....	39
CAPITULO III	40
4.	RESULTADOS.....	40
4.1.	Resultados de la siembra en medio FIM	40
4.1.1.	Análisis General de la siembra en medio FIM	40
4.2.	Resultados de la siembra en medio PDA.....	46
4.2.1	Resultados individuales de crecimiento de colonias en medio PDA.	48
4.3.	Caracterización macroscópica y microscópica de hongos potencialmente micorrízicos	53
5.	DISCUSIÓN.....	65
4.	CONCLUSIONES.....	68
5.	RECOMENDACIONES.....	69
6.	REFERENCIAS	70
7.	ANEXOS	79
8.	GLOSARIO.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Orquídeas según su eje de crecimiento.....	20
Figura 2. Estructura básica de la flor de una orquídea.....	22
Figura 3. Polinización en la especie <i>Chloraea multiflora</i> (orquídea).....	22
Figura 4. Género-forma <i>Rhizoctonia</i> - Células largas y ramificaciones en ángulo 45° y 90°.....	30
Figura 5. Mapa del sitio de muestreo.....	32
Figura 6. Secciones de la raíz (A, B, C).....	34
Figura 7. Observación de pelotones en medio FIM, lente 40X.....	36
Figura 8. Resultados generales de crecimiento en medio FIM.	40
Figura 9. Análisis general porcentual de la siembra en medio FIM.	42
Figura 10. Porcentaje de crecimiento de cepas viables en las tres secciones de raíz, en medio FIM.	42
Figura 11. Resultado de crecimiento de colonias de la especie <i>Odontoglossum hallii</i>	43
Figura 12. Resultado de crecimiento de colonias de la especie <i>Cyrtorchilum macranthum</i>	43
Figura 13. Resultado de crecimiento de colonias de la especie <i>Epidendrum</i> sp1.	44
Figura 14. Resultado de crecimiento de colonias de la especie <i>Epidendrum</i> sp2.	44
Figura 15. Resultado de crecimiento de colonias de la especie <i>Odontoglossum pardinum</i>	45
Figura 16. Resultado de crecimiento de colonias de la especie <i>Pleurothallis</i> sp.....	45
Figura 17. Resultados generales de crecimiento en medio PDA.	46
Figura 18. Análisis general porcentual de la siembra en medio PDA.....	47
Figura 19. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (<i>Odontoglossum hallii</i>).....	48
Figura 20. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (<i>Cyrtorchilum macranthum</i>).	49
Figura 21. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (<i>Epidendrum</i> sp1).....	49
Figura 22. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (<i>Epidendrum</i> sp2).....	50
Figura 23. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (<i>Odontoglossum pardinum</i>).	50



Figura 24. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (<i>Pleurothallis</i> sp).....	51
Figura 25. Análisis general porcentual de cajas seleccionadas para microcultivo.....	52
Figura 26. Porcentaje de crecimiento de hongos potencialmente micorrízicos en las tres secciones de raíz, en cajas seleccionadas para microcultivo.	52
Figura 27. Receta de medio de cultivo FIM.....	79
Figura 28. Receta de medio de cultivo PDA.	79



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica (APG II) de las orquídeas.	19
Tabla 2. Coordenadas Geográficas (UTM) de los puntos de muestreo.	31
Tabla 3. Recolección, desinfección y siembra de raíces en el medio FIM.	35
Tabla 4. Códigos de etiquetado de muestras.	36
Tabla 5. Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos en el medio PDA.	37
Tabla 6. Siembra de hongos en el microcultivo.	38
Tabla 7. Análisis general de la siembra en el medio FIM.	40
Tabla 8. Número de cajas seleccionadas para microcultivo por especie.	51
Tabla 9. Identificación macroscópica y microscópica de los hongos potencialmente micorrízicos.	54
Tabla 10. Identificación macroscópica y microscópica de los hongos descartados y contaminados.	64
Tabla 11. Cultivos de respaldo en tubos de agar inclinado.	80
Tabla 12. Identificación de hongos contaminados mediante la prueba de la cinta.	81



Yo, Blanca Claudina León Chuñir, autora del Trabajo de Titulación "AISLAMIENTO DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS PRESENTES EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL SECTOR SAN PEDRO DE YUMATE, MOLLETURO, AZUAY, ECUADOR", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniera Ambiental. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 19 de Abril de 2017.

Blanca Claudina León Chuñir

C.I. 0104232392



Yo, Santiago Adrián Romero Jiménez, autor del Trabajo de Titulación “AISLAMIENTO DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS PRESENTES EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL SECTOR SAN PEDRO DE YUMATE, MOLLETURO, AZUAY, ECUADOR”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Ambiental. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 19 de Abril de 2017.

Santiago Adrián Romero J.

Santiago Adrián Romero Jiménez

C.I. 0302058680



Yo, Blanca Claudina León Chuñir, autora del Trabajo de Titulación "AISLAMIENTO DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS PRESENTES EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL SECTOR SAN PEDRO DE YUMATE, MOLLETURO, AZUAY, ECUADOR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 19 de Abril de 2017.

Blanca Claudina León Chuñir

C.I. 0104232392



Yo, Santiago Adrián Romero Jiménez, autor del Trabajo de Titulación "AISLAMIENTO DE HONGOS POTENCIALMENTE MICORRÍZICOS PRESENTES EN SEIS ESPECIES DE ORQUÍDEAS NATIVAS DEL SECTOR SAN PEDRO DE YUMATE, MOLLETURO, AZUAY, ECUADOR", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 19 de Abril de 2017.

Santiago Adrian Romero J.

Santiago Adrián Romero Jiménez

C.I. 0302058680

DEDICATORIA.

Este trabajo de titulación va dedicado de manera especial a mi hermana Elizabeth, por ser el sustento de nuestra familia durante todos estos años, por ser mi ejemplo a seguir. Gracias a su noble corazón y sabiduría he podido culminar una meta más. Gracias hermana.

A mis padres, Darío y María, por su inmensa paciencia, con sus ejemplos he aprendido a no decaer, por enseñarme a ser responsable con mi vida. Mamita tu eres mi fuente de inspiración y mí impulso para ser mejor cada día. Admiro tu fortaleza.

A mis hermanas Miriam, Pilar, Sandra y Matilde, por todo su apoyo incondicional, comprensión y cariño que me han sabido brindar.

A mis sobrinos Paul, Joel, Rubén, Xime, Ricardo y Dome, por llenar de alegría a mi vida, para que esto lo tomen como un ejemplo a seguir en sus vidas.

A mi angelito que me acompaña siempre, a la memoria de mi abuelito Manuel, porque todos sus sabios consejos y palabras de apoyo las llevo presente cada. Te extraño tanto.

A toda mi familia y amigos, por su apoyo y confianza.

Blanca León

Le agradezco a Dios por haberme dado a los mejores padres del mundo que me hicieron crecer en un hogar lleno de mucho amor y respeto. Me educaron que nunca hay que rendirse, porque han sido mi fortaleza para mi formación personal como académica.

A mi padre le agradezco por ser la persona más valiente, que con sus buenos consejos ha sabido motivarme día a día para poder llegar a cumplir con todas mis metas. Jorge Romero, mi guerrero, mi viejito, quien con su lucha diaria me ha motivado a salir siempre adelante. A mi madre que siempre me brindó su apoyo incondicional, la que siempre ha estado esperándome en casa y preocupada porque todo me salga bien. Cecilia Jiménez, mi chiquita, gracias por inculcarme buenos valores ya que gracias a eso he llegado a ser quien soy.

A mis hermanos, Eduardo y Juan Pablo, les dedico este logro tan importante para mí. A mis sobrinitos por llenarme de alegría y con sus gestos han sido parte primordial para mi vida y mi carrera.

A mi compañera de tesis Blanca León, le agradezco por soportar mi mal genio durante estos meses que hemos trabajado juntos. Donde pasamos buenos y malos momentos, pero que a pesar de todo hemos sabido trabajar muy bien para el logro de nuestro gran objetivo.

Santiago Romero.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial agradecemos a nuestra directora de tesis Blga. María Elisa Durán Msc. por su invaluable apoyo y conocimientos impartidos durante el inicio, transcurso y culminación de este trabajo. Por la confianza que nos brindó para ser partes del proyecto de investigación desarrollado en el Orquideario de la Universidad de Cuenca. Por tomarse gran parte de su valioso tiempo para compartir con nosotros, y ser la persona más paciente, que han sido la base primordial para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. María Elena Cazar, directora del proyecto de investigación, por la apertura y facilidades que nos brindó con los requerimientos y disponibilidad de equipos para la realización de nuestra tesis.

A la Dra. Raffaella Ansaloni, directora del Orquideario de la Universidad de Cuenca por habernos brindado las facilidades para la toma de muestras y permitirnos el trabajo en el laboratorio del Orquideario.

Al Dr. Geovanny Larriva por su amabilidad y ayuda para la realización de esta tesis.

A Bqf. Mónica Narváez por impartirnos sus conocimientos para desarrollar las técnicas, precauciones y conocimientos del trabajo dentro del laboratorio.

Al Señor Servando Morocho por brindarnos sus conocimientos para la identificación del sitio de muestreo y su gran experiencia para el reconocimiento y recolección de las seis especies de orquídeas. Además por sus vastos conocimientos acerca del Orquideario de la Universidad de Cuenca.

Al Dr. Rodrigo Caroca, al que consideramos un amigo, que gracias a sus revisiones, conocimientos y recomendaciones impartidas, pudimos agregar información de gran relevancia.

A todos los Docentes Universitarios de la Carrera de Ingeniería Ambiental, que gracias a sus enseñanzas y experiencias propias, nos han ayudado a obtener todos los conocimientos que serán un punto clave para nuestra vida profesional.

A nuestras compañeras tesistas, gracias por toda su colaboración y por la linda amistad que se formó durante el desarrollo de la tesis.

A Elizabeth León, por la ayuda que nos brindó en el diseño del trabajo de titulación.

INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos más diversos del reino Plantae, se estima que una de cada diez plantas en el mundo son orquídeas (Chase *et al.*, 2003; Dressler, 2005). Ecuador, Colombia y Perú son países con gran diversidad de orquídeas, distribuidas principalmente en las regiones andinas (Gil, 2012). En Ecuador se contempla que existen alrededor de 4.200 especies de orquídeas descritas, de las cuales 1.300 son endémicas (Jorgensen y León, 1999; Jorgensen *et al.*, 2006). Esta gran diversidad en el país se debe a la presencia de la Cordillera de los Andes (Jijón y Navarrete, 2009), razón por la cual se conoce a Ecuador como el primer país con mayor número de especies de orquídeas (Bussmann, 2005; Jorgensen *et al.*, 2006).

En la provincia del Azuay y en general en todo el Ecuador, la disminución de flora y fauna es uno de los principales problemas ambientales, dado por todas las actividades antropogénicas que se realizan (Prefectura del Azuay, 2015), como la alteración del entorno por contaminación ambiental, incendios, deforestación; y el comercio sin ningún tipo de control (Tellez *et al.*, 2007; Mayo *et al.*, 2000; CITES, 2013). La familia Orquidaceae, es vulnerable ante estos cambios, dificultando el crecimiento, desarrollo y propagación de estas especies en su medio silvestre, que en su hábitat natural se encuentran amenazadas y en peligro, por lo que el CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) considera a las orquídeas dentro de su apéndice II, estableciendo un comercio controlado (CITES, 2013; Crespo y Ortega, 2015). De igual manera, en el Ecuador, un gran número de especies de la familia Orchidaceae se encuentran en el Libro Rojo (Valencia *et al.*, 2000).

Existen medidas alternativas para incorporar programas de conservación *ex-situ*, que permiten disminuir la pérdida masiva de especies nativas, teniendo como fin integrar a las orquídeas a su medio natural (Valencia *et al.*, 2000; Prefectura del Azuay, 2015), de esta manera se permite que estas especies sobrevivan, ante el efecto negativo que realiza el ser humano (Valencia *et al.*, 2000; Prefectura del Azuay, 2015).

Las orquídeas, en su medio natural, debido a que son plantas carentes de endospermo, es decir, no poseen fuentes nutricionales, necesitan de una simbiosis con hongos específicos llamados micorrízicos para la germinación de las semillas, la ausencia de estos dificultan su posterior desarrollo (Crespo y Ortega, 2015).

A nivel del país, la investigación sobre la relación entre planta-hongo de la familia Orchidaceae, su importancia en el ecosistema y la conservación *ex-situ*, ha sido poco estudiada. Es por esto, que la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de



Cuenca, dentro del proyecto de investigación “*Reproducción de orquídeas a partir de sus semillas utilizando medios orgánicos e inorgánicos*”, se crea un orquideario para el estudio y conservación de la familia Orchidaceae.

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto “*Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador*”, que realiza la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC), dentro de su primera etapa; con esta investigación se pretende generar y llenar ciertos vacíos de información de diversidad fungal con respecto a las micorrizas presentes en las raíces de las orquídeas epífitas en la parroquia Molleturo, provincia del Azuay.

– **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de hongos potencialmente micorrízicos de seis especies de orquídeas nativas del sector San Pedro de Yumate, perteneciente a la parroquia Molleturo, Provincia del Azuay, Ecuador.

– **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Seleccionar, identificar y extraer raíces de las seis especies de orquídeas nativas en el sector San Pedro de Yumate, Molleturo.
- Proveer las condiciones adecuadas para el aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos de las muestras de raíces de orquídeas recolectadas.
- Identificar las cepas de hongos aislados a través de claves de identificación morfológica, en la bibliografía existente.

CAPÍTULO I

1. ORQUÍDEAS

1.1. Generalidades de las orquídeas.

El término “orquídea” procede del vocablo griego *orchis*, que significa “testículo” (Banks, 2006). La familia Orchidaceae se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, constituyendo uno de los grupos más diversos de plantas (Endara *et al.*, 2010). Se conoce alrededor de 25.000 especies, presentándose en casi todas las regiones del planeta a excepción de los desiertos extremos y tierras permanentemente heladas (Chase *et al.*, 2003; Dressler, 2005). La mayor cantidad de especies se encuentran en los trópicos, donde muchas de ellas son epífitas en troncos y ramas de árboles, obtienen nutrientes del aire, lluvia y desechos de los árboles (Mosquera, 2010). Existen en menor cantidad orquídeas terrestres, las cuales adquieren nutrientes del suelo, aire y agua (Mosquera, 2010). Las especies de zonas templadas y frías poseen una gran adaptabilidad a una variedad de hábitats (Mosquera, 2010). Los estudios relacionados a conservación de orquídeas han generado que el número de taxa se incremente, siendo de gran aporte para la ciencia (Soto, 1996; Arditti y Ghani, 2000).

Las orquídeas constituyen una de las familias más llamativas por su gran diversidad y formas florales, las especies más vistosas han sido muy apetecidas en el mercado desde tiempos antiguos, por lo que su comercio ilegal va en aumento (Rasmussen, 2002).

1.2. Importancia de las Orquídeas.

Las orquídeas son consideradas entre las plantas más desarrolladas y especializadas (Hágsater y Dumont, 1996). Estas plantas pueden ser terrestres, epífitas y litófitas (Smith y Read, 2008). Posee una amplia distribución, encontrándose desde los trópicos hasta las regiones árticas, donde un gran número de organismos polinizadores dependen de esta familia (Ávila, 2012), y son utilizadas como indicadores de estabilidad de ecosistemas (Rivera, 2001).

Poseen una gran importancia económica en el campo de la horticultura, debido a su gran diversidad florística (Griesbach, 2002). También son utilizadas para el disfrute de las personas en ambientes privados y públicos, ya que poseen un efecto decorativo de consideración agradable (Tiza, 2010). De igual manera son utilizadas para dar sabor a alimentos y bebidas como es el caso de la *Vainilla planifolia* (Dodson, 1991; Griesbach, 2002).

1.3. Importancia de orquídeas nativas del Ecuador.

Al tomar en cuenta el número de especies en relación con su superficie geográfica, se considera a Ecuador como el primer país con mayor número de orquídeas, constituyendo el 20% de la diversidad de flora a nivel nacional (Bussmann, 2005; Jorgensen *et al.*, 2006; Velasco, 2007; Jijón y Navarrete, 2009), encontrándose la mayor diversidad entre los 1000 y 3000 m.s.n.m (Jijón y Navarrete, 2009). A pesar de lo expuesto, en el país no se ha invertido suficientes recursos en investigación y regulación del comercio ilegal de esta familia (Ávila, 2012).

En Ecuador las orquídeas han sido utilizadas principalmente para venta, dado por su belleza y diversidad florística (Serrano, 2007). La comercialización de esta familia ha generado fuentes de trabajo en industrias dedicadas al cultivo y venta de orquídeas (Serrano, 2007). La venta de esta especie en el mercado se da por medio de plántulas o como flores cortadas (Serrano, 2007).

A causa de la pérdida de hábitats y especies, las orquídeas se encuentran en el Apéndice II de la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre) (UICN, 1996; CITES, 2013). Mediante este convenio concertado entre Gobiernos se busca regular el comercio internacional de flora y fauna silvestre, exportación e importación de especies vivas o muertas, de sus partes o derivados. De manera que no se amenace su supervivencia, por medio de aplicación de mecanismos de conservación y protección, en miras de una sostenibilidad en el uso de recursos naturales (CITES, 2010; CITES, 2013).

1.4. Taxonomía.

Tabla 1. Clasificación taxonómica (APG II) de las orquídeas.

REINO	PLANTAE
Subreino	Tracheobionta
División	Angiospermas
Clase	Monocotiledóneas
Subclase	Liliadae
Orden	Asparagales
Familia	Orchidaceae

Fuente: Mark y James, 2009.

1.5. Hábitat

Son consideradas plantas herbáceas perennes que necesitan de una simbiosis con micorrizas para la germinación de semillas (Espinoza, 2010).

- Terrestres.- En su mayoría estas orquídeas crecen en un compuesto de tierra y desechos vegetales, después de la floración las hojas se marchitan y permanecen órganos de reserva, conocido como rizomas (Banks, 2006; Fischer, 2007; Paredes, 2012). Poseen fases de crecimiento, floración y reposo que ayudan a la supervivencia y reproducción en climas severos (Banks, 2006).
- Epífitas.- La mayoría de orquídeas poseen esta caracterización, crecen sobre árboles que actúa como soporte o sustrato que proporciona condiciones perfectas para el desarrollo de las orquídeas como es la cantidad de luz y además reciben corrientes de aire que les permite estar perfectamente drenados (Banks, 2006; Fischer, 2007; Paredes, 2012).
- Litófitas.- La característica de estas orquídeas es el crecimiento sobre rocas (Fischer, 2007; Paredes, 2012).

1.6. Características generales de las orquídeas.

1.6.1. Tipo de crecimiento

De acuerdo con el eje de crecimiento se dividen en dos grupos: las orquídeas simpodiales poseen un tallo principal o pseudobulbo encargado de acumular agua y nutrientes, se produce anualmente y madura al final de cada periodo de crecimiento culminando con la floración (Rivas *et al.*, 1998; Banks, 2006). En cambio las orquídeas monopoidales, no poseen pseudobulbo, presentan un tallo central que crece continuamente produciendo hojas e inflorescencia a partir de las axilas de estas (Banks, 2006; Kuan y González, 1993) (Figura 1).

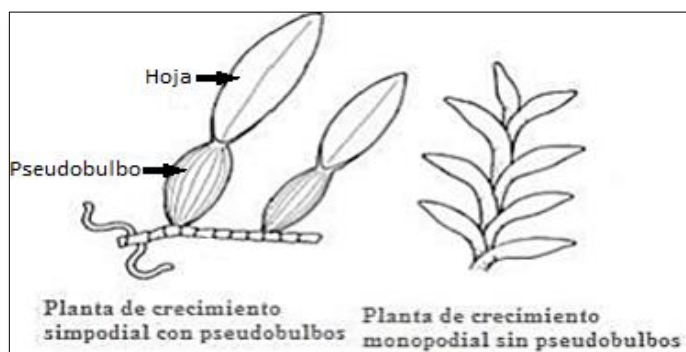


Figura 1. Orquídeas según su eje de crecimiento.

Fuente: Dodson, 1991.

1.6.2. Ciclo vegetativo.

Cuando las condiciones son favorables las orquídeas pueden vivir varios años y su floración es anual, la presencia de tubérculos favorece a su adaptabilidad a condiciones desfavorables (Rasmussen, 2002).

1. Germinación.-

Las semillas de las orquídeas son sumamente pequeñas y carecen de nutrimentos, constan de embrión y testa, desprovisto de endospermo, siendo necesaria la asociación simbiótica con hongos micorrízicos especializados presentes en el suelo (Rasmussen, 2002), generalmente son del género *Rhizoctonia*. Estos hongos son indispensables para su germinación como proveedores de nutrientes a los embriones, posteriormente aporta de azúcares y nutrientes a las plántulas (Otero *et al.*, 2002; Paredes, 2012). Las especies de orquídeas varían en sus preferencias por hongos micorrízicos (Serrano, 2007). La presencia de estos hongos es mucho más necesaria en orquídeas terrestres, debido a que en los primeros ciclos de vida el protocormo no puede fotosintetizar sus nutrientes (McKendrick, 2000).

2. Reproducción.-

- a) *Floración.-* Se estima que el tiempo de floración se da a partir de los dos años (Moreira, 1877). Son especies consideradas monocotiledóneas, su desarrollo se da en dos ciclos florales: el cáliz formado por sépalos y la corola formada por pétalos (McKendrick, 2000). La flor consta de tres sépalos y tres pétalos, el pétalo del medio es llamado labelo, posee una modificación en su tamaño, forma y color; tiene la función de servir de pista de aterrizaje para los insectos visitantes y polinizadores (Banks, 2006; Freuler, 2007). También posee una pieza central que recibe el nombre de columna, aquí se produce el polen y contiene los órganos sexuales masculino y femenino (Figura 2) (Jijón, 2007), que al ser fecundado y en su etapa de maduración dará origen al fruto (Paredes, 2012).

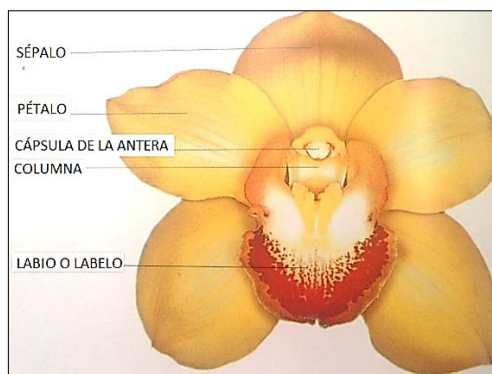


Figura 2. Estructura básica de la flor de una orquídea.

Fuente: Rittershausen *et al.*, 2007.

- b) *Polinización.*- La infinidad de variedad de formas de las orquídeas ejercen atracción sobre los polinizadores, esta atracción es provista por la fragancia, facilitando el intercambio de polen (Banks, 2006; Rasmussen, 2002). El polen puede tener la apariencia de polvo o granular, en su mayoría de veces se presenta en forma compactada, redonda o aplastada, llamada polonios (Tiza, 2010). La mayoría son plantas polinizadas por insectos (Figura 3), sin embargo en zonas tropicales la polinización también puede ser desarrollada por aves y mamíferos (Moreira, 1887).



Figura 3. Polinización en la especie *Chlorea multiflora* (orquídea).

Fuente: Darwin, 2007.

- c) *Fecundación.*- Para que la fecundación se lleve a cabo es necesario que la polinización se dé previamente (Moreira *et al.*, 2009). Los granos de polen germinan sobre la superficie estigmática y los tubos de polen se extienden hacia el ovario (Tiza, 2010). La fertilización puede tardar desde días hasta meses (Moreira *et al.*, 2009; Tiza, 2010). Si esto no ocurre, la cápsula o

fruto detiene su desarrollo y muere; en caso de producirse se desarrollan los embriones (Tiza, 2010).

- d) *Dispersión de las semillas*. - Debido a su bajo peso tienen la facilidad de desplazarse cientos de kilómetros los cuales pueden ser arrastrados por corrientes de aire y por corrientes de agua dulce (Moreira *et al.*, 2009).

1.7. Descripción de las orquídeas utilizadas en la investigación.

1.7.1. Género: *Odontoglossum*

Etimología: Su nombre proviene del latín **odontos** que significa diente y **glossa** lengua; en alusión a la presencia de dos protuberancias en forma de dientes en la base del labelo (Banks, 2006). El género *Odontoglossum* incluye alrededor de 300 especies (Rittershausen *et al.*, 2007). En el Ecuador existen alrededor de 60 especies (Banks, 2006). Son consideradas plantas epífitas (Rittershausen *et al.*, 2007), exhiben flores amarillas con manchas marrones en forma de araña (Banks, 2006). Crecen en climas fríos de las regiones montañosas de Sudamérica así como en las laderas andinas (Banks, 2006).

Odontoglossum hallii



Fotografía: Santiago Romero J.

Especie: *Odontoglossum hallii*

Clasificación según Lindley (1992).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Tajt.

Superorden: Liliales Tajt.

Orden: Asparagales Enlace

Familia: Orchidaceae Juss.

Género: *Odontoglossum* Kunth

Especie: *Odontoglossum hallii*

Nombre común: Orquídeas tigre

Estado de Conservación:

Apéndice II - Comercio controlado para evitar un uso incompatible con la supervivencia de la especie.

Odontoglossum pardinum

Fotografía: Santiago Romero J.

Especie: *Odontoglossum praestans*

Clasificación según Lindley (1992).

Clase: Equisetopsida C. Agardh**Subclase:** Magnoliidae Novák ex Tajt.**Superorden:** Liliales Tajt.**Orden:** Asparagales Enlace**Familia:** Orchidaceae Juss.**Género:** *Odontoglossum* Kunth**Especie:** *Odontoglossum pardinum***Nombre común:** Orquídeas tigre**Estado de Conservación:**

Apéndice II - Comercio controlado para evitar un uso incompatible con la supervivencia de la especie.

1.7.2. Género: *Oncidium*

Etimología: Su nombre proviene del latín **onkos** que significa masa, hinchazón, en alusión a que posee un callo verrugoso en la base del labelo (Banks, 2006). Posee alrededor de 400 especies provenientes de América tropical. En el Ecuador existen alrededor de 97 especies (Rittershausen *et al.*, 2007). Son consideradas plantas epífitas.

La especie *Cyrtorchilum macranthum* (*Oncidium macranthum*) es considerada como una de las más grandes del género (Banks, 2006).

***Cyrtorchilum macranthum* (*Oncidium macranthum*)**

Fotografía: Santiago Romero J.

Especie: *Cyrtorchilum macranthum*

Clasificación según Kraenzlin (2010).

Clase: Equisetopsida C. Agardh**Subclase:** Magnoliidae Novák ex Tajt.**Superorden:** Liliales Tajt.**Orden:** Asparagales Enlace**Familia:** Orchidaceae Juss.**Género:** *Cyrtorchilum* Kunth**Especie:** *Cyrtorchilum macranthum***Nombre común:** Angelitos**Estado de Conservación:**

Apéndice II - Comercio controlado para evitar un uso incompatible con la supervivencia de la especie.

1.7.3. Género: *Epidendrum*

Etimología: Su nombre proviene del griego **epi** que significa encima y **dendron** árbol (Banks, 2006); en alusión a la estrategia epífita de estas orquídeas en troncos de los árboles (Rittershausen *et al.*, 2007). El género *Epidendrum* cuenta con alrededor de 1000 especies. Son orquídeas originarias de América Central y del Sur (Banks, 2006). En el Ecuador existen alrededor de 452 especies (Banks, 2006).

Son plantas altas, poseen tallos rígidos; una parte de ellas poseen pseudobulbos altos y delgados con un par de hojas rígidas que presentan una forma ovalada y alargada.

Epidendrum sp. (1)



Fotografía: Santiago Romero J

Género: *Epidendrum* sp.

Clasificación según Linnaeus, (2010).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Tajt.

Superorden: Liliales Tajt.

Orden: Asparagales Enlace

Familia: Orchidaceae Juss.

Género: *Epidendrum* L.

Nombre común: Flor de cristo

Estado de Conservación:

Apéndice II - Comercio controlado para evitar un uso incompatible con la supervivencia de la especie.

Epidendrum sp. (2)



Fotografía: Santiago Romero J.

Género: *Epidendrum* sp.

Clasificación según Linnaeus, (2010).

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Tajt.

Superorden: Liliales Tajt.

Orden: Asparagales Enlace

Familia: Orchidaceae Juss.

Género: *Epidendrum* L.

Nombre común: Flor de cristo

Estado de Conservación:

Apéndice II - Comercio controlado para evitar un uso incompatible con la supervivencia de la especie.

1.7.4. Género: *Pleurothallis* sp.

Etimología: Su nombre proviene del latín **pleuros** que significa costilla y **thallos** brote; en alusión a los tallos planos que tiene esta especie (Rittershausen *et al.*, 2007). El género *Pleurothallis* posee alrededor de 1200 orquídeas de los trópicos americanos (Rittershausen *et al.*, 2007). En el Ecuador existen alrededor de 473 especies (Banks, 2006). Son plantas epífitas que viven en bosques tropicales montañosos y entornos abiertos (Banks, 2006).

Son tolerantes a una variedad de temperaturas, como también a la luz intensa (Rittershausen *et al.*, 2007).

<i>Pleurothallis</i> sp.	
	Clasificación según Brown (2011).
	Clase: Equisetopsida C. Agardh Subclase: Magnoliidae Novák ex Tajt. Superorden: Lillanae Tajt. Orden: Asparagales Enlace Familia: Orchidaceae Juss. Género: <i>Pleurothallis</i> R. Br.
Fotografía: Santiago Romero J. Género: <i>Pleurothallis</i> sp.	Estado de Conservación: Apéndice II - Comercio controlado para evitar un uso incompatible con la supervivencia de la especie

2. MICORRIZAS

2.1. Asociaciones micorrízicas.

Las micorrizas son las estructuras que se forman como resultado del fenómeno simbiótico entre uno o varios hongos con las raíces de las plantas (Smith y Read, 2008). Esta simbiosis es llamada mutualista dándose un intercambio de nutrientes y minerales, donde los hongos como la planta hospedera se benefician (Díaz *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2010). Esta simbiosis es necesaria y fundamental para su germinación y desarrollo, debido a que mediante esta dependencia los hongos se benefician de fuentes carbonadas provenientes de la planta, aumentando su capacidad de absorción de nutrientes minerales (Domsch *et al.*, 1980; Kristiansen *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2010). Además le imparten otros beneficios como: incremento de la tasa fotosintética, estimulación de sustancias reguladoras de crecimiento,

incremento de la resistencia a plagas, ajustes osmóticos en tiempos de sequía, mejoran la agregación del suelo, tolerancia a estrés ambiental y son considerados como mediadores de muchas acciones e interacciones de la microflora y microfauna que ocurren en el suelo y alrededor de las raíces (Hermard *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2010). La identificación de estos hongos se complica al analizarse de forma macroscópica, por lo cual es necesario realizar cultivos o analizar protocormos, raíces, tubérculos o rizomas de orquídeas (Bougoure *et al.*, 2005; Martos *et al.*, 2009).

2.2. Importancia de las micorrizas

Se ha determinado que la presencia de micorrizas favorece en el crecimiento de la planta, absorción, solubilidad y acumulación de ciertos nutrientes indispensables para su crecimiento (Barea y Jeffries, 1995; Agrios, 2002). Permiten que se prolongue el tiempo de vida de las raíces alimentadoras y regula el microambiente creando resistencia a infecciones generados por hongos dañinos para la especie (Barea y Jeffries, 1995; Agrios, 2002).

Las micorrizas también cumplen un papel importante en cuanto a la agricultura sostenible logrando disminuir el uso de insumos químicos (Blanco y Salas, 1996). La simbiosis que forman las micorrizas, ha hecho que se desarrollen estudios sobre el potencial como fertilizante biológico.

Son capaces de producir diversas hormonas, entre ellas auxinas y citoquininas que ayudan al desarrollo de las orquídeas, permitiendo la movilización de nutrientes y facilitando el crecimiento apical radicular (Coyne, 2000).

2.3. Clases de micorrizas

Existen diferentes clases de micorrizas en dependencia de las estructuras que los hongos desarrollan en las raíces, se distinguen los siguientes grupos:

1. Endomicorrizas.- Son las más abundantes en la naturaleza, sus hifas penetran en el interior de las células del córtex y/o epidermis de la raíz, este tipo de hongos no forman manto (Currah, 1991). El grupo más abundante de endomicorrizas presenta hifas aseptadas, vesículas y estructuras ramificadas. El segundo grupo consta de hongos con hifas septadas que invaden las células de la raíz sin romper la membrana plasmática y crecen dentro de la célula formando estructuras abultadas (Coyne, 2000).
2. Orquideaomicorrizas.- hongos asociadas a orquidáceas, entre sus principales géneros son: *Armillariella*, *Gymnopilus*, *Marasmius*, *Fome*, *Xerotus*, *Corticium*, *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Tulasnella* (Paillacho, 2010).

3. Ericomicorrizas.- Hongos asociados a la Familia Ericáceas, poseen semejanzas estructurales con las ectoendomicorrizas (Paillacho, 2010).
4. Micorrizas Arbusculares.- Pueden formar arbusculos intracelulares, son considerados de mayor producción e importancia ecológica y económica (Paillacho, 2010).
5. Ectomicorrizas.- Su presencia se da principalmente en especies de plantas con interés forestal, siendo aproximadamente el 3% del total de las asociaciones micorrízicas. Las hifas del hongo no penetran las células vegetales de la raíz (Smith y Read, 1997; Agrios, 2002). El desarrollo en el interior de la raíz da lugar a una estructura característica denominada red de Harting y en el exterior, un entramado de hifas rodea la raíz formando un llamado manto (Smith y Read, 1997; Agrios, 2002).
6. Ectendomicorrizas.- Presenta características similares a las micorrizas ya expuestas, pueden formar un manto más o menos desarrollado y red de Hartig. Existe una ligera penetración de las hifas en las células de la corteza formando enrollamientos (Yuan *et al.* 2009). El género principal es *Endogone*.

2.4. Factores ecológicos relacionados a la micorrización.

Entre los factores de mayor importancia se encuentra los siguientes:

1. Luz.- El aumento de micorrizas es proporcional al número de raíces, siempre y cuando se aumente la intensidad luminosa (Barea y Jeffries, 1995; Paillacho, 2010).
2. Temperatura.- La temperatura adecuada está en un rango entre 17 y 27 °C, se considera que la temperatura tiene una acción directa sobre la producción de nuevas raíces y también sobre el crecimiento radial (Paillacho, 2010).
3. Agua y aireación.- La mayoría de los hongos micorrízicos son aerobios, por lo cual son dependientes del oxígeno y al presentarse una disminución de la disponibilidad de oxígeno el crecimiento micelar decrece. Estas formaciones también son dependientes de la humedad presente en el suelo (Paillacho, 2010).
4. Suelos y fertilidad.- Entre uno de los factores más importantes en la formación de micorrizas es el humus en el suelo, resultado de la descomposición de la materia orgánica, generando nitrógeno, fósforo y potasio que requiere la planta para su desarrollo (Barea y Jeffries, 1995; Hermard *et al.*, 2002). La cantidad y calidad disminuye con la profundidad. Al existir carencias de nitrógeno, fósforo

y potasio, se dificulta o impide la formación micorrízica y también el desarrollo radicular (Hermard *et al.*, 2002).

2.5. Micorrizas de orquídeas

Estos hongos alimentan a los embriones de las semillas proveyéndolas de nutrientes y minerales, al descomponer moléculas orgánicas complejas a formas más simples (Castro, 2003). Los hongos presentes en las raíces de las orquídeas crean una estructura denominada enrollamiento hifal y que al ser degradado por la planta se obtienen nutrientes, estas estructuras formadas por el hongo son denominados pelotones (Breddy 1991; Rasmussen 2002). Esta asociación cumple una función importante para el eficaz abastecimiento de los recursos minerales del suelo y en la defensa de las raíces contra patógenos (Castro, 2003; Barrer, 2009). La simbiosis entre el hongo y la orquídea se presenta para facilitar la germinación de las semillas y la obtención de nutrientes por medio de las raíces de la planta. La interacción entre la planta, hongo y suelo ha conllevado a recopilar información de los suelos y hábitats donde se encuentran estas micorrizas (Brundrett, 2009).

2.6. Géneros simbiotes orquidioides

La mayoría de los hongos presentes en esta agrupación son basidiomicetos del género-forma *Rhizoctonia*, a veces las orquídeas forman una dependencia con el hongo, que se considera que la planta lo parasita (Valadares, 2009; Mosquera, Bayman y Otero, 2010; Valadares *et al.*, 2012).

2.6.1. Identificación de género- forma *Rhizoctonia*.

Es un grupo de hongos filamentosos que no generan esporas asexuales, comparten caracteres morfológicos entre ellos la coloración parda en medios sintéticos y la formación de micelio (Castro, 2003). Para la familia Orchidaceae se considera como hongo formador de micorrizas, comprende un grupo complejo y diverso con más de 100 especies. Son considerados anamorfos que pertenecen al phylum *Basidiomycota* y a la clase *Basidomycete* (Valadares *et al.*, 2012; Otero, *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2009). Muchos de estos organismos son patógenos de plantas de interés forestal, agrícola y acuático. Algunos son considerados saprófitos, viven en materia orgánica en descomposición donde establecen relaciones de simbiosis con especies de orquídeas y musgos (Castillo, 2005).

2.6.2. Morfología de *Rhizoctonia*

En su fase asexual presenta un micelio estéril incoloro, a medida que madura se torna oscura. Está formado por hifas alargadas, delgadas y gruesas con septos y

ramificaciones en ángulos de 45° y 90° (Figura 4) con relación a la hifa principal (Castillo, 2005).

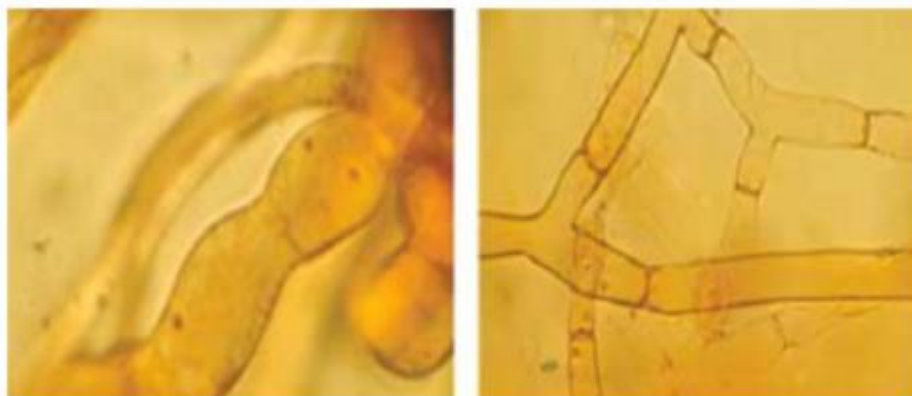


Figura 4. Género-forma *Rhizoctonia* - Células largas y ramificaciones en ángulo 45° y 90°

Fuente: Mosquera, 2010.

El género-forma *Rhizoctonia* está compuesto por diversos grupos polifilético que incluye especies patógenas, saprófitas y endófitas, simbióticos en micorrizas con orquídeas, con los órdenes: *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Thanatephorus* y *Sebacina* como los hongos más comunes en orquídeas (Warcup y Talbot, 1967; Rasmussen, 2002; Bayman y Otero 2006; Otero *et al.*, 2011).

Para el aislamiento de hongos simbioses con orquídeas como *Rhizoctonia*, es necesario la formación de colonias, debido a la metodología empleada universalmente obteniéndose colonias en condiciones axénicas (Otero, *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2008).

CAPÍTULO II

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio.

El área de estudio se encuentra ubicada en el sector San Pedro de Yumate perteneciente a la parroquia Molleturo, provincia del Azuay, situada al noroeste de la ciudad de Cuenca (Figura 5). San Pedro de Yumate es considerado como bosque siempre verde montano alto de Cordillera Occidental de los Andes, representados por epífitas (bromelias) y grandes cantidades de helechos (GAD Molleturo, 2015).

La investigación es de tipo experimental en la cual se analizaron seis especies diferentes de orquídeas epífitas nativas del sector San Pedro de Yumate, siendo las siguientes: *Pleurothallis* sp, *Edipendrum* sp1, *Edipendrum* sp2, *Odontoglossum hallii*, *Cyrtorchilum macranthum* y *Odontoglossum pardinum*. La toma de muestras se realizó en los meses de noviembre y diciembre del 2016, a una altitud que varía desde los 3.000 a 3.100 ms.n.m, con las siguientes coordenadas (Tabla 2).

Tabla 2. Coordenadas Geográficas (UTM) de los puntos de muestreo.

Coordenadas UTM			
X	Y	ALTURA	ZONA
675516	9696018	3002 m.s.n.m	17 M
675538	9695645	3083 m.s.n.m	17 M
675538	9695642	3078 m.s.n.m	17 M
DATUM:	WGS84		

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero.



MAPA DEL SITIO DE MUESTREO

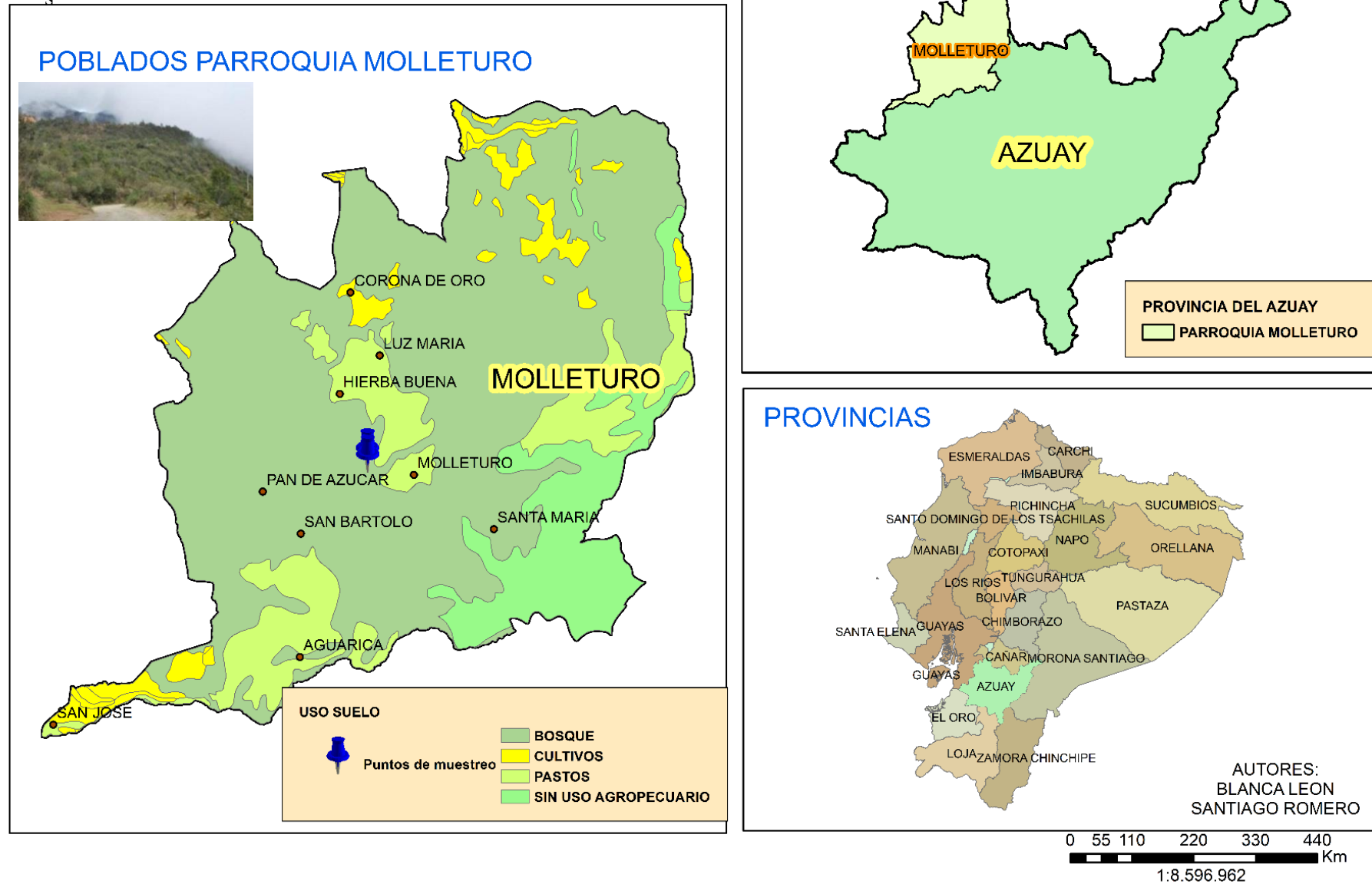


Figura 5. Mapa del sitio de muestreo

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero.

3.2. Métodos.

Para el estudio se empleó la metodología propuesta por Zettler *et al.*, (2013), para la recolección de raíces, siembra y aislamiento de los hongos potencialmente micorrízicos. Según Zettler *et al.* (2007), para el aislamiento de hongos de las orquídeas, es preferible utilizar raíces jóvenes donde se encuentran la mayor cantidad de pelotones activos y que serán los más probables de ser aislados.

Para el procesamiento y análisis de datos que se obtuvieron durante todo el estudio, se utilizó Microsoft Excel para elaboración de tablas, gráficos y cálculos requeridos.

3.2.1. Recolección de raíces de orquídeas epífitas

En el sitio de muestreo se colectaron orquídeas epífitas que presentaron características favorables como la ubicación, desarrollo y abundancia. Al localizar la orquídea, se dejaron expuestas las raíces para la toma de muestras. El tamaño de la muestra comprende 10 fragmentos de raíces jóvenes de una longitud entre 5 a 10 cm de las 6 especies determinadas, con sus respectivas réplicas, dando un total de 20 raíces por especie. Las muestras recolectadas se trasladaron en condiciones adecuadas y de esterilidad al Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas. De cada raíz se tomaron 3 fragmentos de 1 cm de longitud que corresponden a la sección basal (A), parte media (B) y apical (C), obteniendo 60 fragmentos por especie, dándonos un total de 360 fragmentos de raíz.

3.3. Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos.

3.3.1. Cultivos *in vitro* para la germinación de orquídeas.

Los métodos y medios de cultivo para el procesamiento de las raíces fueron elegidos en base a investigaciones de estudios previos, en condiciones similares a este trabajo experimental y con resultados positivos (Zettler, 2013).

1. **Medio FIM (Fungi Isolation Medium):** Este medio es usado para el aislamiento del hongo a partir de la raíz de la orquídea. Los compuestos de su formulación son considerados como nutrientes necesarios para el crecimiento y aislamiento del hongo (Rueda, 2004; Narrea, 2006). Para evitar la contaminación bacteriana es indispensable el uso de estreptomicina (Narrea, 2006). (Figura 27) (Ver Anexo).

2. **Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa):** Este medio es ampliamente utilizado para aislamiento, purificación y mantenimiento de colonias. Por su rica formulación favorece el crecimiento de los micelios (Rueda, 2004). La siembra en este medio se realiza con el fin de aislar y replicar los hongos para uso inmediato o para mantener viable por un tiempo corto (Cañedo, 2004). (Figura 28) (Ver Anexos).

3.3.2. Preparación y siembra de la raíz de la orquídea en el medio FIM.

Las raíces recolectadas fueron sometidas a un proceso de desinfección superficial para retirar los restos de materia orgánica. Se lavaron con agua corriente añadiendo unas gotas de jabón líquido, para la desinfección se sumergieron en la solución de lavado preparada con 5ml de cloro y 5ml de alcohol al 85% en 90 ml de agua destilada, por 10 minutos.

Se transfirieron las raíces a una caja Petri estéril y dentro de la cámara de flujo laminar, donde se dividieron las raíces en tres secciones proporcionales de 1 cm de longitud correspondiente a la sección basal (A), parte media (B) y apical (C) (Figura 6), los restos de raíces fueron descartados.

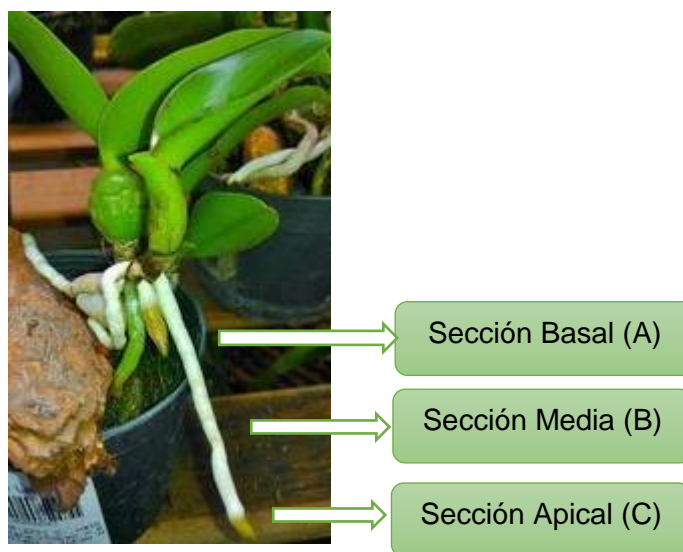




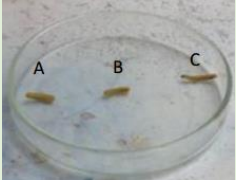






Figura 6. Secciones de la raíz (A, B, C).

Fuente: Castillo, 2005; Modificación propia, 2016.

Las secciones fueron cortadas de aproximadamente 1 cm de longitud y se colocaron en cajas Petri con una gota de agua estéril. Se cortó cada sección en minúsculos pedazos y se vertió directamente el medio FIM (Fungi Isolation Medium), utilizado para el aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos. Se llevó a una temperatura de 25°C de 8 a 10 días, los procesos realizados se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Recolección, desinfección y siembra de raíces en el medio FIM.

 <p>PASO 1: Recolección de la raíz.</p>	 <p>PASO 2: Traslado de raíces en condiciones adecuadas y de esterilidad.</p>
 <p>PASO 3: Desinfección de la raíz: lavado con agua corriente- lavado con agua estéril.</p>	 <p>PASO 4: Desinfección de la raíz: lavar con solución de lavado por 10 min.</p>
 <p>PASO 5: Se realizan cortes de 1cm de las tres secciones de la raíz y pasar cada segmento a cajas Petri.</p>	 <p>PASO 6: Verter 1cc de agua estéril en el segmento y proceder a cortar en minúsculos pedazos (forma picadillo).</p>
 <p>PASO 7: Verter directamente el medio FIM sobre el picadillo de raíz.</p>	 <p>PASO 8: Rotular claves de identificación.</p>
 <p>PASO 9: Las cajas Petri se las incuba en una estufa a 25°C hasta la obtención de resultados.</p>	

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero

Para el etiquetado se establecieron códigos con las iniciales de las especies muestreadas (OH, CM, E1, E2, OP, PS), acompañado del número de raíz y la sección de raíz; se añade una "R" en caso de réplica; y al final se escribió el medio utilizado ya sea FIM o PDA (Tabla 4).

Tabla 4. Códigos de etiquetado de muestras.

<i>Especies</i>	<i>Iniciales</i>	<i>Numero de Raíz</i>	<i>Sección de Raíz</i>	<i>Ejemplo</i>
<i>Odontoglossum hallii</i>	(OH)	1-10	A,B,C	OH-1A-FIM
Réplica				
<i>Epidendrum sp1.</i>	(E1)	1-10	A,B,C	E1- 4BR-FIM

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero

3.3.3. Observación de pelotones en el medio FIM.

Después de las 48 horas de incubación, se observaron los pelotones de las cajas sembradas en el medio FIM, se utilizó un microscopio óptico y a través del lente 40x se tomaron las fotografías (Figura 7).

Además, se evaluó el crecimiento de cada una de las colonias para la verificación de alteraciones en color y forma, que es indicativo de contaminación.

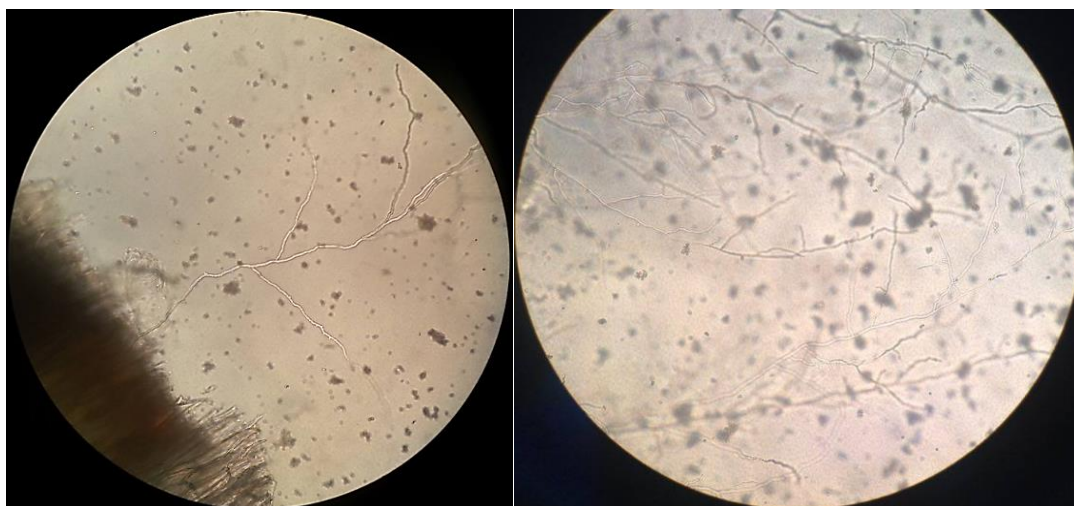


Figura 7. Observación de pelotones en medio FIM, lente 40X.

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero.


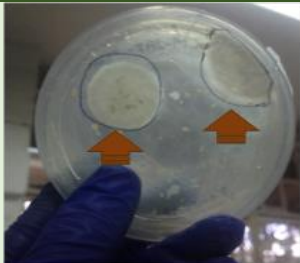





3.3.4. Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos en el medio PDA.

Las colonias que presentaron un crecimiento adecuado fueron sembrados en medio PDA para la purificación, conservación y mantenimiento de hongos (Cañedo, 2004) (Tabla 5), se utilizó la clasificación según Barnett y Hunter (2003), basado en la caracterización macroscópica de las colonias, como la coloración del micelio (blanco, marrón y crema), la textura (algodonosa y esponjosa) y la morfología (radial y ramificada).

Las muestras fueron etiquetadas de igual manera que en el medio FIM (Tabla 4), cambiándose únicamente el medio utilizado y se incubaron a 25 °C hasta la obtención de resultados.

En el análisis de resultados las muestras se clasificaron en base a las características que presentaron: 1) muestras seleccionadas para el microcultivo; 2) muestras con colonias contaminadas y 3) muestras descartadas debido a que la coloración que presenta el micelio no concuerda con las características analizadas (Zettler *et al.*, 2013).

Tabla 5. Aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos en el medio PDA.

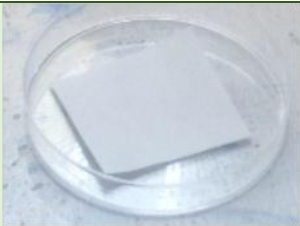


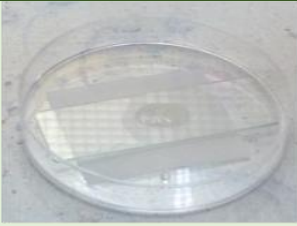




 <p>PASO 1: Observación macroscópica de las colonias formadas en medio FIM.</p>	 <p>PASO 2: Selección de colonias que van a ser aisladas.</p>
 <p>PASO 3: Verter el medio PDA sobre cajas Petri para que se solidifiquen.</p>	 <p>PASO 4: Corte de una sección de colonia de 1mm x 1mm.</p>
 <p>PASO 5: Traslado de sección a la parte media de la caja Petri.</p>	 <p>PASO 6: Rotular claves de identificación.</p>
 <p>PASO 7: Las cajas Petri se las incuban en una estufa a 25°C hasta la obtención de resultados.</p> <p>Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero</p>	

3.3.5. Microcultivo

Como análisis previo al microcultivo, se evalúa las características según Barnett y Hunter (2003), basado en la caracterización que presenta un hongo micorrízico, tal como la textura ya sea algodonosa o esponjosa; la coloración del micelio que en su fase inicial es de coloración blanca y se torna parda a medida que envejece y la morfología radial o ramificada, este análisis corrobora Zettler *et al.*, (2013).

En una caja Petri, se colocó papel filtro estéril, el cual fue cubierto por un portaobjetos añadido tres gotas de medio PDA, se sembró la colonia seleccionada y se colocó una lámina cubreobjetos. Se incubó la muestra a 25°C por ocho días, como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Siembra de hongos en el microcultivo

 PASO 1: Colocación del papel filtro en una caja Petri.	 PASO 2: Humedecer el papel filtro con H2O estéril para el crecimiento del hongo.
 PASO 3: Colocar tres gotas de medio PDA en un portaobjetos.	 PASO 4: Colocar el portaobjetos en la caja sobre el papel humedecido.
 PASO 5: Selección de una colonia del medio PDA.	 PASO 6: Corte de una sección de colonia y su traslado al medio PDA de la caja Petri.
 PASO 7: Rotular claves de identificación.	 PASO 8: Las cajas Petri se las incubó en una estufa a 25°C hasta la obtención de resultados.

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero

Una vez que los hongos fueron identificados como potencialmente micorrízicos sembrados en el medio PDA, se hizo un cultivo de respaldo en tubos de agar inclinado, como se puede observar en la Tabla 11 (Ver Anexos).

3.3.6. Prueba de identificación de hongos contaminados

Mediante esa prueba se confirma que tipo de hongos contaminaron las muestras, de igual manera se puede verificar la abundancia de hongos propios de la microbiota y ambientales. Las colonias fueron agrupadas en dependencia de las características macroscópicas que presentaron, de cada grupo se tomó una muestra para el análisis.

En un portaobjetos se colocó azul de metileno y con un pedazo cinta adhesiva se extrajo una parte superficial del micelio, posteriormente se colocó en un portaobjetos y se observó en el microscopio con el lente 40x. Este procedimiento se puede observar en la Tabla 12 (Ver Anexos).

3.4. Identificación macroscópica y microscópica de hongos.

En la etapa final se buscaron las características de los Basidiomicetos a través de claves de identificación morfológica de Barnett y Hunter, (2003). Además se obtendrá y mantendrá cepas viables para posteriores estudios del proyecto, sobre “La relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador”, auspiciado por la DIUC.

3.4.1. Características macroscópicas evaluadas.

Textura: Se distinguen 2 tipos, algodonoso que presenta crecimiento en forma superpuesta y en orientación vertical, de igual manera el esponjoso cuyo crecimiento es en forma de ramificaciones y en orientación horizontal (Barnett y Hunter, 2003).

Coloración del micelio: En la etapa juvenil su coloración es blanca, al madurar presenta tonalidades crema y marrón principalmente (Barnett y Hunter, 2003).

Morfología: Generalmente se analizan 2 tipos, en forma radial la biomasa presenta un crecimiento circular al inóculo, y ramificada la biomasa presenta un crecimiento irregular y con prolongaciones alrededor del inóculo (Barnett y Hunter, 2003).

3.4.2. Características microscópicas evaluadas.

Hifas: Pueden presentar en forma alargada o ancha, con septos, que formen ángulos de 45° y 90° (Barnett y Hunter, 2003).

CAPITULO III

4. RESULTADOS

4.1. Resultados de la siembra en medio FIM

4.1.1. Análisis General de la siembra en medio FIM

Después de la siembra, se obtuvieron un total de 360 cajas en medio FIM, 60 cajas por especie, de las cuales: 20 correspondieron a la sección A, 20 a la sección B y 20 a la sección C. En la Tabla 7 se detalla el análisis general de la siembra en el medio FIM.

Tabla 7. Análisis general de la siembra en el medio FIM.

Nombre de la especie	Número de fragmentos de raíz sembrados en medio FIM (*)	Número de cajas con colonias replantadas en medio PDA (**)	Número de cajas con colonias contaminadas	Número de cajas sin crecimiento
<i>Odontoglossum hallii</i>	60	13	24	23
<i>Cyrtorchilum macranthum</i>	60	25	23	12
<i>Epidendrum</i> sp1.	60	12	31	17
<i>Epidendrum</i> sp2.	60	15	28	17
<i>Odontoglossum pardinum</i>	60	11	33	16
<i>Pleurothallis</i> sp.	60	22	19	19

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

(*) Se incluye la repetición por especie

(**) Colonias determinadas morfológicamente como potencialmente micorrízicas.

En síntesis, con respecto al número total de cajas sembradas (n=360), 98 cajas fueron replantadas en PDA (27,2%), 158 cajas presentaron contaminación (43,9%) y 104 cajas sin crecimiento (28,9%), como se pueden ver en la Figura 8.

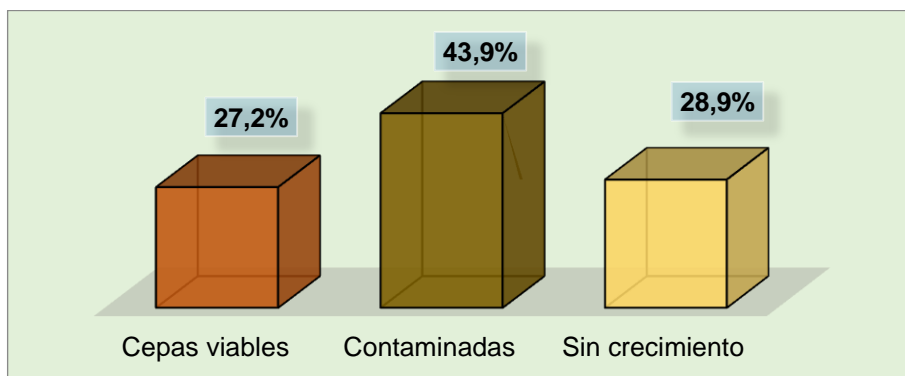


Figura 8. Resultados generales de crecimiento en medio FIM.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

4.1.2. Análisis General del crecimiento de colonias en medio FIM

En el análisis general en el medio FIM se tuvieron tres categorías de análisis: 1) Cajas con cepas viables, 2) Cajas con colonias contaminadas y 3) Cajas sin crecimiento (Figura 9).

En los resultados obtenidos se puede ver claramente dos tendencias en cuanto al porcentaje de cepas viables presentes en las especies estudiadas. En la primera tendencia las especies *Cyrtochilum macranthum* y *Pleurothallis* sp, poseen el mayor porcentaje de cepas viables 42% y 37% respectivamente, sin embargo en la primera especie el segundo porcentaje corresponde a cajas con colonias contaminadas y en el de *Pleurothallis* sp, posee el mismo porcentaje de cajas sin crecimiento y cajas contaminadas. En la segunda tendencia las especies *Odontoglossum hallii*, *Epidendrum* sp1, *Epidendrum* sp2 y *Odontoglossum pardinum* obtuvieron un mayor porcentaje de cajas con colonias contaminadas. En la Figura 9, se detalla las tendencias en el medio FIM.

Se analizó los cultivos de las raíces de seis especies de orquídeas, donde la especie *Cyrtochilum macranthum* obtuvo el mayor porcentaje (41,7%) de cajas con cepas viables para ser replantados en medio PDA; mientras que *Odontoglossum pardinum* tuvo el menor porcentaje (18,3%). De las cuatro especies restantes, tres de ellas (*Odontoglossum hallii*, *Epidendrum* sp1 y *Epidendrum* sp2), presentaron en promedio un porcentaje (22,23%) cercano al rango inferior de cajas con cepas viables. Por el contrario la especie *Pleurothallis* sp, (36,7%) se aproxima al porcentaje de rango superior de cajas con cepas viables.

Las cajas que presentaron mayor contaminación fueron de la especie *Odontoglossum pardinum* (55%). Mientras que *Pleurothallis* sp presentó la menor contaminación (31,7%). En general, la contaminación de las cajas se dio por hongos propios de la microbiota y ambientales; y en menor proporción por levaduras.

El mayor porcentaje de cajas sin crecimiento durante un período de 8 días, fue de la especie *Odontoglossum hallii* (38,3%) y el menor porcentaje para *Cyrtochilum macranthum* (20%). En la Figura 9, se detalla el análisis general porcentual de la siembra en el medio FIM.

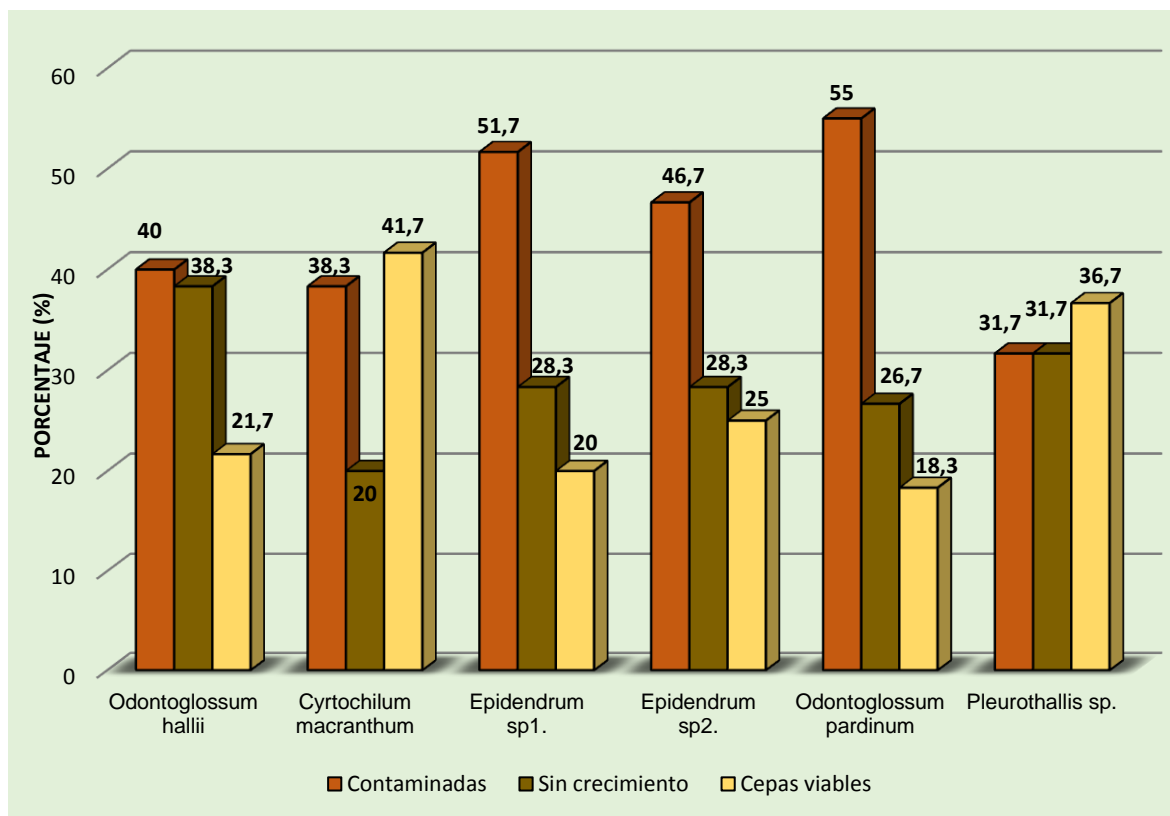


Figura 9. Análisis general porcentual de la siembra en medio FIM.

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero.

4.1.3. Análisis General del crecimiento de colonias en los tres segmentos de raíz (A, B, C) en medio FIM.

De las 98 cajas que presentaron cepas viables para ser replantadas en medio PDA, la mayor colonización se presentó en la sección media (B) con un porcentaje del 37,8%, seguido de la sección basal (A) 32,7% y finalmente la sección apical (C) 29,6% (Figura 10).

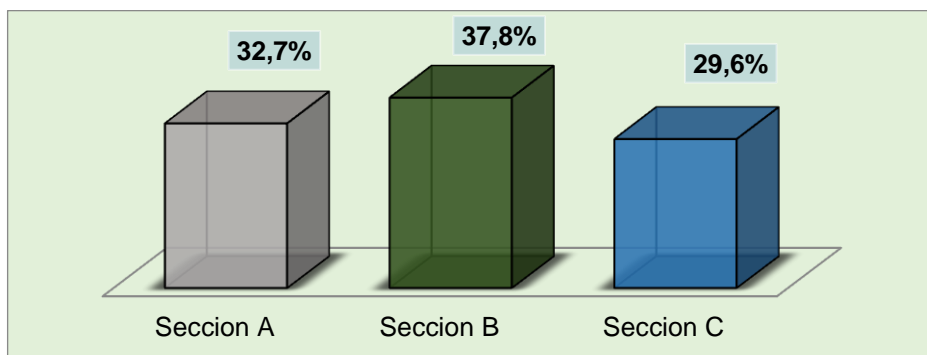


Figura 10. Porcentaje de crecimiento de cepas viables en las tres secciones de raíz, en medio FIM.

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero.

4.1.4. Resultados individuales de crecimiento de colonias en medio FIM.

– **Especie: *Odontoglossum hallii***

En el medio FIM de la especie *Odontoglossum hallii*, se sembraron 60 cajas (incluidas las repeticiones), de las cuales 24 cajas presentaron contaminación (40%), 23 cajas sin crecimiento (38,3%) y 13 cajas con cepas viables (21,7%), que se replantaron en medio PDA (Figura 11).

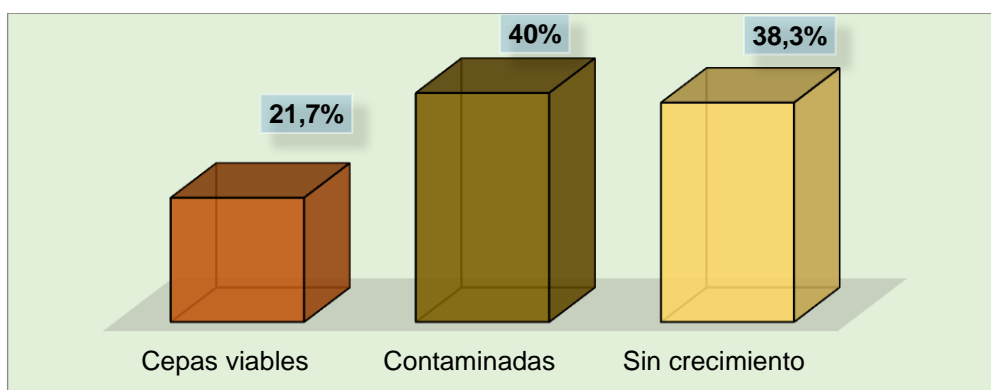


Figura 11. Resultado de crecimiento de colonias de la especie *Odontoglossum hallii*.

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero

Con respecto a las 13 cajas cepas viables, 5 correspondieron al fragmento A (38,5%), 5 al fragmento B (38,5%) y 3 al fragmento C (23,1%).

– **Especie: *Cyrtochilum macranthum***

De las 60 cajas iniciales de la especie *Cyrtochilum macranthum*, 23 cajas presentaron contaminación (38,3%), 12 cajas sin crecimiento (20%) y 25 cajas con cepas viables (41,7%), que se replantaron en medio PDA (Figura 12).

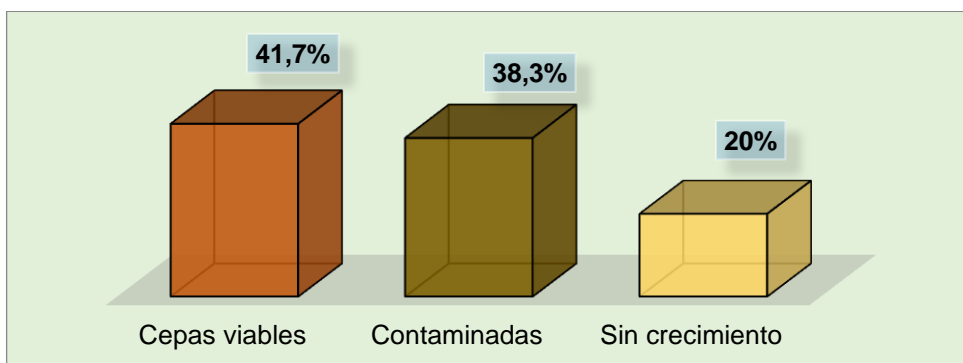


Figura 12. Resultado de crecimiento de colonias de la especie *Cyrtochilum macranthum*.

Elaborado por: Blanca León y Santiago Romero

Con relación a las 25 cajas con cepas viables, 10 correspondieron al fragmento A (40%), 11 al fragmento B (44%) y 4 al fragmento C (16%).

– **Especie: *Epidendrum* sp1.**

De las 60 cajas iniciales de la especie *Epidendrum* sp1, 31 cajas presentaron contaminación (51,7%), 17 cajas sin crecimiento (28,3%) y 12 cajas con cepas viables (20%), que se replantaron en medio PDA (Figura 13).

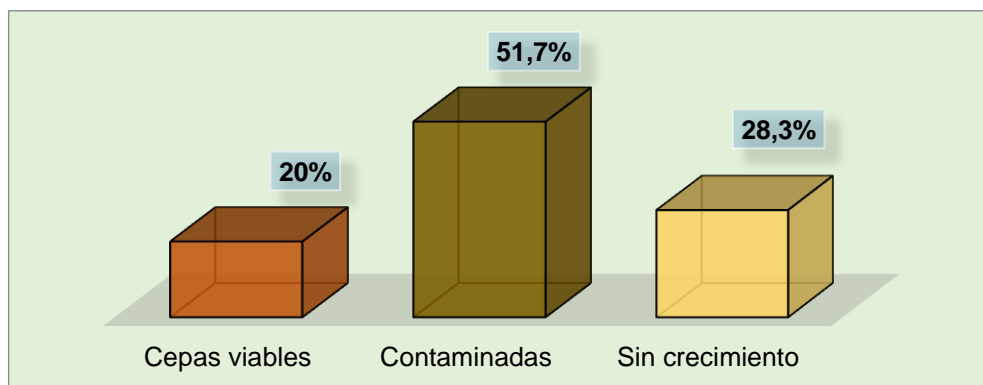


Figura 13. Resultado de crecimiento de colonias de la especie *Epidendrum* sp1.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

De las 12 cajas con cepas viables, 3 correspondieron al fragmento A (25%), 4 al fragmento B (33,3%) y 5 al fragmento C (41,7%).

– **Especie: *Epidendrum* sp2.**

De las 60 cajas iniciales de la especie *Epidendrum* sp1, 28 cajas presentaron contaminación (46,7%), 17 cajas sin crecimiento (28,3%) y 15 cajas con cepas viables (25%), que se replantaron en medio PDA (Figura 14).

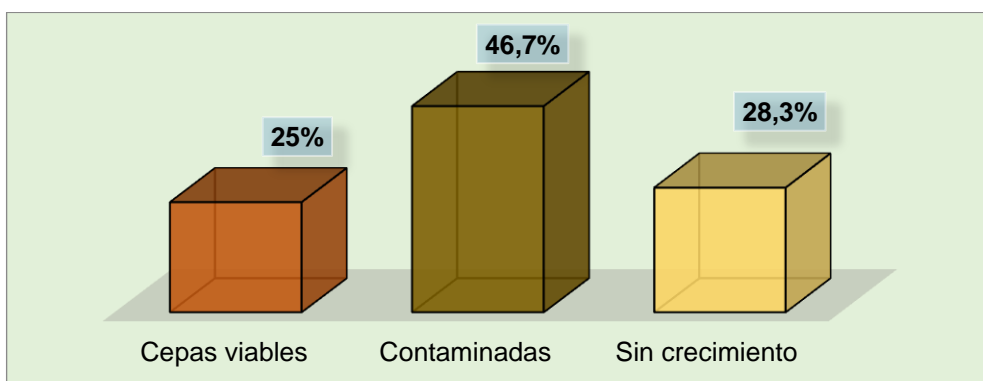


Figura 14. Resultado de crecimiento de colonias de la especie *Epidendrum* sp2.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

Con respecto a las 15 cajas con cepas viables, 3 correspondieron al fragmento A (20%), 7 al fragmento B (46,7%) y 5 al fragmento C (33,3%).

– **Especie: *Odontoglossum pardinum***

De las 60 cajas iniciales de la especie *Odontoglossum pardinum*, 33 cajas presentaron contaminación (55%), 16 cajas sin crecimiento (26,7%) y 11 cajas con cepas viables (18,3%), que se replantaron en medio PDA (Figura 15).

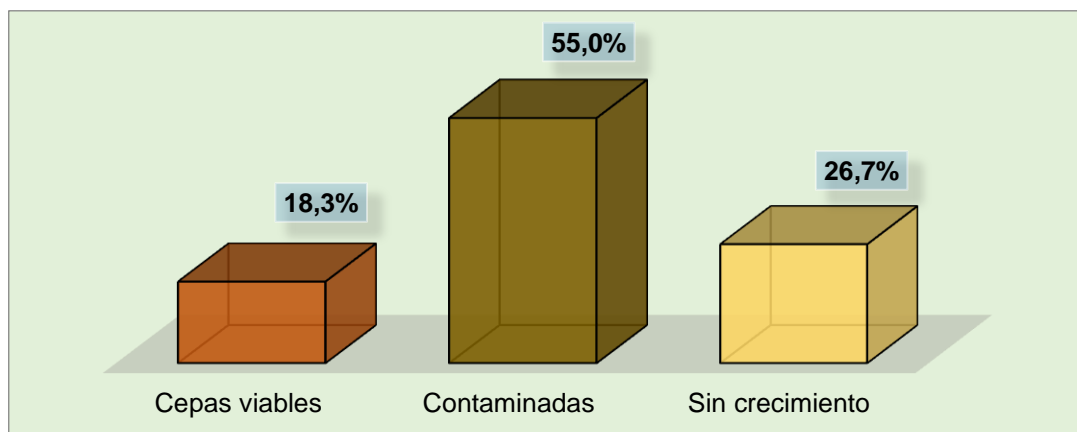


Figura 15. Resultado de crecimiento de colonias de la especie *Odontoglossum pardinum*.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

Con relación a las 11 cajas con cepas viables, 4 correspondieron al fragmento A (36,4%), 2 al fragmento B (18,2%) y 5 al fragmento C (45,5%)

– **Especie: *Pleurothallis* sp.**

De las 60 cajas iniciales de la especie *Pleurothallis* sp, 19 cajas presentaron contaminación (31,7%), 19 cajas sin crecimiento (31,7%) y 22 cajas con cepas viables (36,7%), que se replantaron en medio PDA (Figura 16).

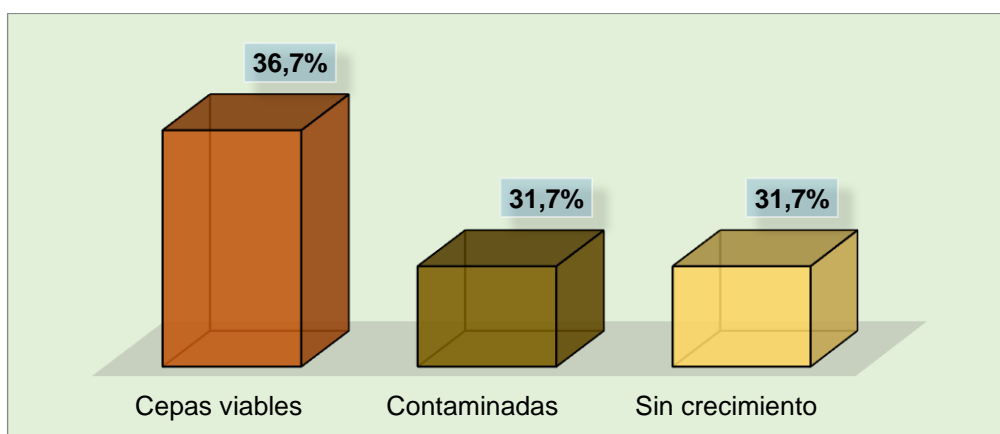


Figura 16. Resultado de crecimiento de colonias de la especie *Pleurothallis* sp.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

De las 22 cajas con cepas viables, 7 correspondieron al fragmento A (31,8%), 8 al fragmento B (36,4%) y 7 al fragmento C (31,8%).

4.2. Resultados de la siembra en medio PDA

4.2.1. Análisis General de la siembra en medio PDA.

Con respecto al número total ($n=98$) de cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos replantadas en medio PDA, 68 cajas presentaron contaminación (69,4%) y 30 cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos fueron seleccionados para microcultivo (30,6%) (Figura 17).

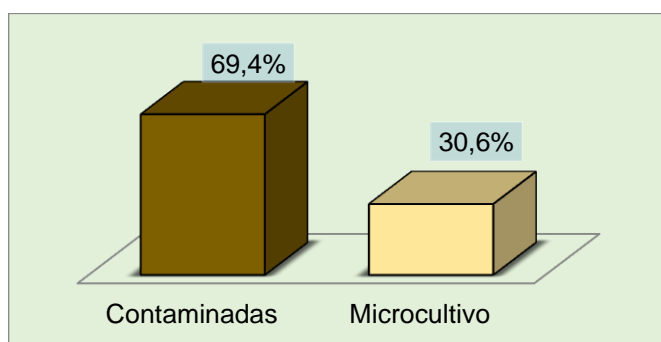


Figura 17. Resultados generales de crecimiento en medio PDA.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

4.2.2. Análisis General del crecimiento de colonias en el medio PDA.

Durante el análisis general en el medio PDA se tendrán dos categorías a analizar: 1) Cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos y 2) Cajas con colonias contaminadas (Figura 18).

En todas las cajas que fueron replantadas al medio PDA se observó el crecimiento de colonias con hongos potencialmente micorrízicos y colonias de contaminación. De manera que la categoría cajas sin crecimiento no fue tomada en cuenta. Para el análisis de las cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos no existieron muestras descartadas, debido a que todas presentaron las características morfológicas de la literatura.

En los resultados del crecimiento de colonias en medio PDA se puede observar claramente dos tendencias con respecto al porcentaje de hongos potencialmente micorrízicos de las seis especies de orquídeas estudiadas. En la primera tendencia las especies *Odontoglossum halli* y *Epidendrum* sp1, obtuvieron el mayor porcentaje de hongos potencialmente micorrízicos. En la segunda tendencia las especies *Cyrtorchilum macranthum*, *Epidendrum* sp2, *Odontoglossum pardinum* y *Pleurothallis*

sp, tuvieron el mayor porcentaje en cajas con colonias contaminadas. En la Figura 18, se detalla las tendencias que se presentan en el medio PDA.

Del análisis de los cultivos de las raíces de seis especies de orquídeas, la especie *Epidendrum* sp1, obtuvo el mayor porcentaje (66,7%) de cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, mientras que *Cyrtorchilum macranthum* tuvo el menor porcentaje (12%). De las cuatro especies restantes, dos de ellas *Epidendrum* sp2 y *Pleurothallis* sp (20,3%), presentaron en promedio un porcentaje cercano al rango inferior de cajas con hongos potencialmente micorrízicos. Por el contrario en las especies *Odontoglossum halli* y *Odontoglossum pardinum* (45,1%), se aproximan al porcentaje de rango superior de cajas con hongos potencialmente micorrízicos.

La cajas que presentaron mayor contaminación fue de la especie *Cyrtorchilum macranthum* (88%), mientras que *Epidendrum* sp1 presentó la menor contaminación (33,3%). En general, la contaminación de las cajas se dio por hongos del ambiente. En la Figura 18, se detalla el análisis general porcentual de la siembra en el medio PDA.

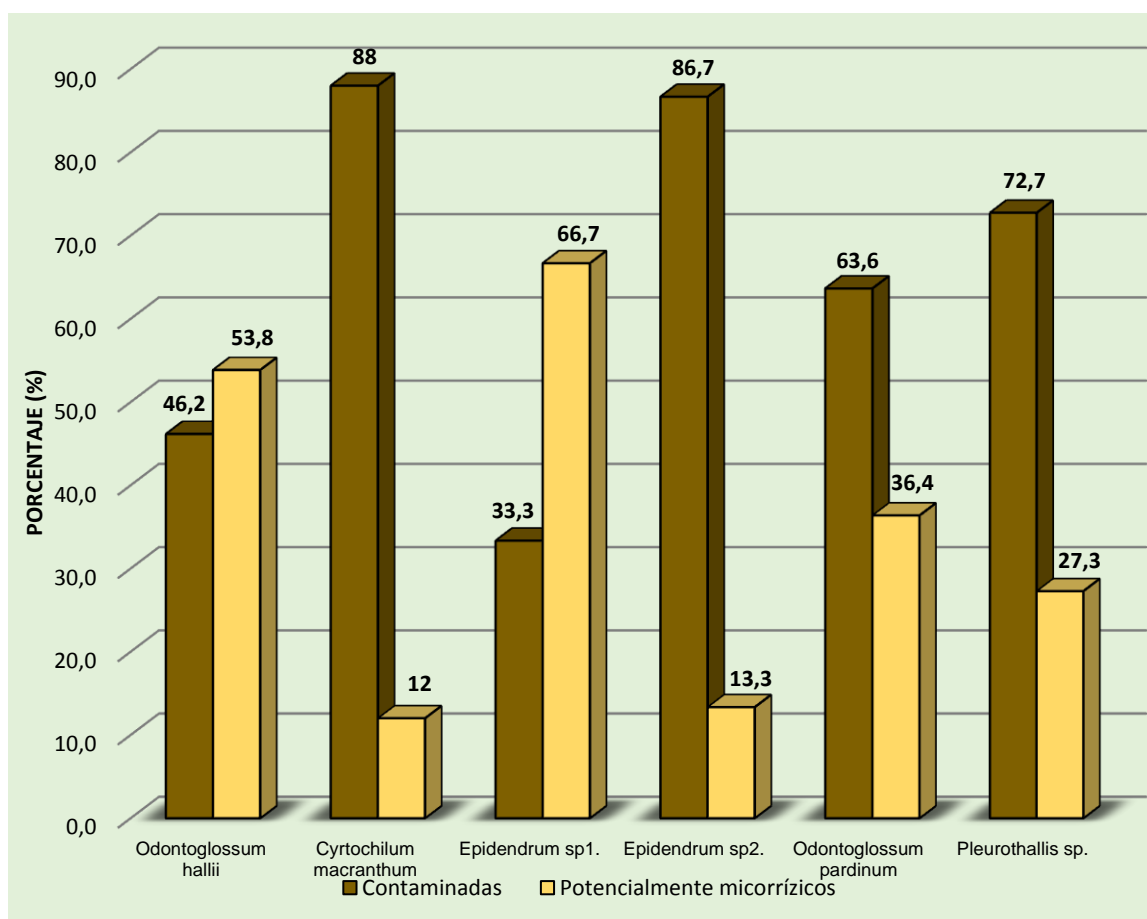


Figura 18. Análisis general porcentual de la siembra en medio PDA.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

4.2.1 Resultados individuales de crecimiento de colonias en medio PDA.

En el análisis individual por especie, en las cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos existió un porcentaje que se contaminó y otro que correspondió a las cajas que fueron seleccionadas para el microcultivo, porque presentaban las características morfológicas de hongos potencialmente micorrízicos.

– **Especie: *Odontoglossum hallii***

Los resultados de las cajas replantadas en medio PDA de la especie *Odontoglossum hallii*, un total de 13 cajas se caracterizaron como hongos potencialmente micorrízicos, 6 cajas presentaron contaminación (46,2%) y 7 cajas con colonias seleccionadas para microcultivo (53,8%) (Figura 19).

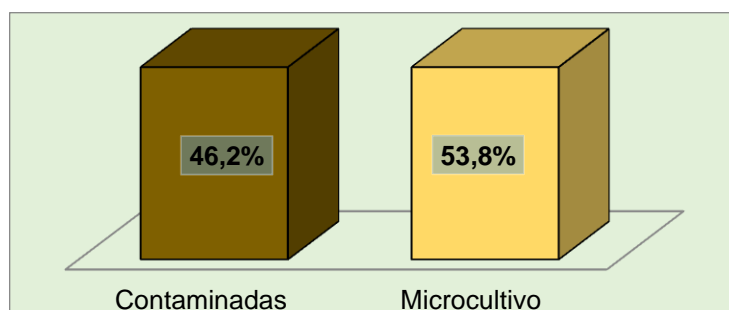


Figura 19. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (*Odontoglossum hallii*).

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

Con relación a las 7 cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, 2 correspondieron al fragmento A (28,6%), 2 al fragmento B (28,6%) y 3 al fragmento C (42,9%).

– **Especie: *Cyrtorchilum macranthum***

De la especie *Cyrtorchilum macranthum*, se obtuvieron un total de 25 cajas con hongos potencialmente micorrízicos, 22 cajas presentaron contaminación (88%) y 3 cajas con colonias seleccionadas para microcultivo (12%) (Figura 20).

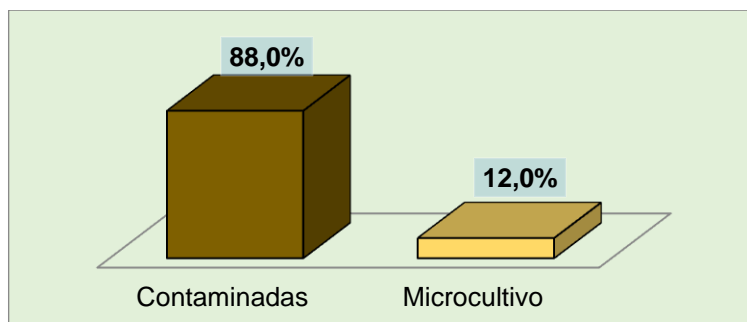


Figura 20. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (*Cyrtosporium macranthum*).

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

De las 3 cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, 1 correspondió al fragmento A (33,3%) y 2 al fragmento B (66,7%).

– **Especie: *Epidendrum* sp1.**

De la especie *Epidendrum* sp1, un total de 12 cajas fueron caracterizados como hongos potencialmente micorrízicos, 4 cajas presentaron contaminación (33,3%) y 8 cajas con colonias seleccionadas para microcultivo (66,7%) (Figura 21).

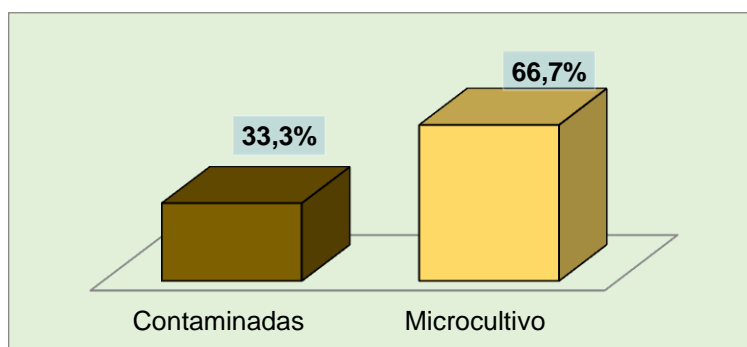


Figura 21. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (*Epidendrum* sp1).

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

Con respecto a las 8 cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, 3 correspondieron al fragmento A (37,5%), 1 al fragmento B (12,5%) y 4 al fragmento C (50%).

– **Especie: *Epidendrum* sp2.**

De la especie *Epidendrum* sp2, un total de 15 cajas se caracterizaron como hongos potencialmente micorrízicos, 13 cajas presentaron contaminación (86,7%) y 2 cajas con colonias seleccionadas para microcultivo (13,3%) (Figura 22).

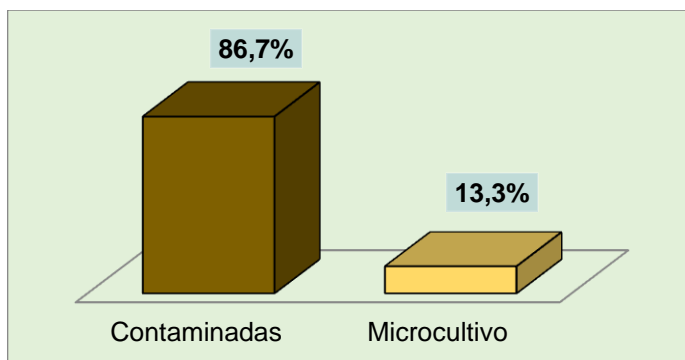


Figura 22. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (*Epidendrum* sp2).

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

Con relación a las 2 cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, 1 correspondió al fragmento B (50%) y 1 al fragmento C (50%).

– **Especie: *Odontoglossum pardinum***

De la especie *Odontoglossum pardinum*, un total de 11 cajas presentaron características de hongos potencialmente micorrízicos, 7 cajas presentaron contaminación (63,6%) y 4 cajas con colonias seleccionadas para microcultivo (36,4%) (Figura 23).

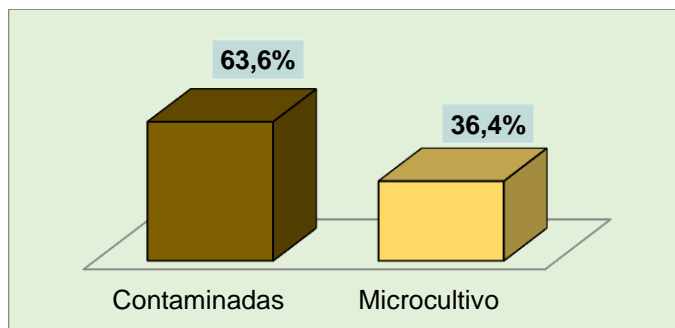


Figura 23. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (*Odontoglossum pardinum*).

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

De las 4 cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, 3 correspondieron al fragmento A (75%) y 1 al fragmento C (25%).

– **Género: *Pleurothallis* sp.**

De la especie *Pleurothallis* sp, un total de 22 cajas presentaron características de los hongos potencialmente micorrízicos, 16 cajas presentaron contaminación (72,7%) y 6 cajas con colonias seleccionadas para microcultivo (27,3%) (Figura 24).

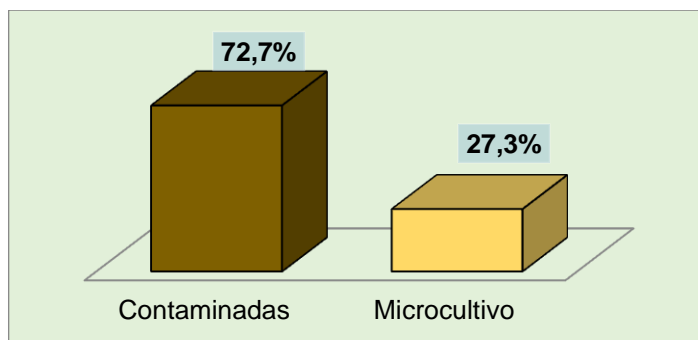


Figura 24. Porcentaje de cajas con colonias contaminadas y porcentaje de cajas seleccionadas para microcultivo (*Pleurothallis* sp.).

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

Con respecto a las 6 cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, 1 correspondió al fragmento A (16,7%), 2 al fragmento B (33,3%) y 3 al fragmento C (50%).

4.2.3. Análisis General de las cajas seleccionadas para microcultivo.

Como resultado, de las 98 cajas con hongos potencialmente micorrízicos, se analizaron 30 cajas con colonias para el microcultivo. En la Tabla 8, se puede observar la cantidad de cajas seleccionadas para microcultivo.

Tabla 8. Número de cajas seleccionadas para microcultivo por especie.

Especies de orquídeas	TOTAL
<i>Odontoglossum hallii</i>	7
<i>Cyrtochilum macranthum</i>	3
<i>Epidendrum</i> sp1.	8
<i>Epidendrum</i> sp2.	2
<i>Odontoglossum pardinum</i>	4
<i>Pleurothallis</i> sp.	6
	30

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

En el Figura 25 se observan las especies de orquídeas con mayor porcentaje de crecimiento de las colonias seleccionadas para el microcultivo. *Epidendrum* sp1 con ocho cajas (26,7%) y *Odontoglossum hallii* con siete cajas (23,3%).

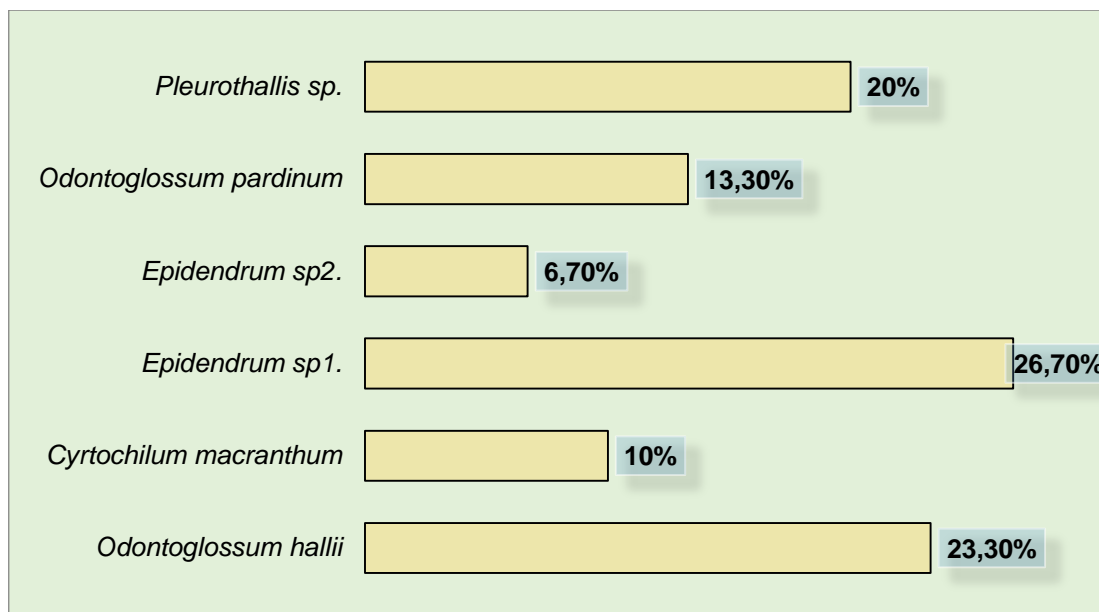


Figura 25. Análisis general porcentual de cajas seleccionadas para microcultivo.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero.

4.2.4. Análisis General del crecimiento de colonias en los tres segmentos de raíz (A, B, C) seleccionados para el microcultivo.

Del total de cajas con colonias seleccionadas para el microcultivo (n=30) (30,6%) con respecto a las 98 cajas sembradas en el medio PDA, se presentó una mayor colonización de hongos potencialmente micorrízicos en la sección apical (C) con un porcentaje del 40%, seguido de la sección basal (A) 33,3% y finalmente la sección media (B) con un 26,7% (Figura 26).

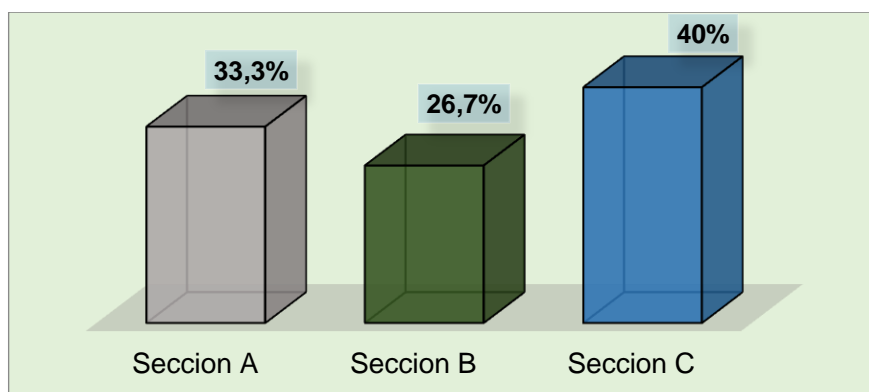


Figura 26. Porcentaje de crecimiento de hongos potencialmente micorrízicos en las tres secciones de raíz, en cajas seleccionadas para microcultivo.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

4.3. Caracterización macroscópica y microscópica de hongos potencialmente micorrízicos.



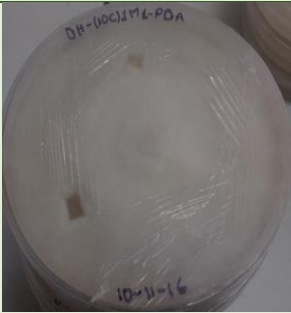



4.3.1. Identificación de hongos aislados



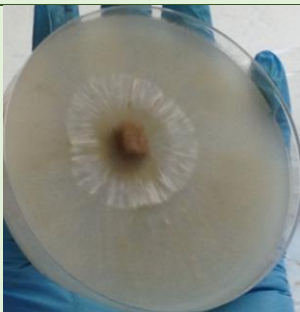



La identificación morfológica macroscópica y microscópica para posibles *Tulasnellas* sp se realizó en base a claves taxonómicas propuestas por Barnett y Hunter (2003), y la caracterización de los posibles *Ceratobasidium* sp, se realizó de acuerdo a Hoang et al., (2016), Guzmán y Moreno (2014). La morfología analizada se encuentra en el apartado 3.4.1 de la metodología.

En esta fase, de las 30 muestras seleccionadas para el microcultivo, 2 muestras analizadas (6,66%), fueron identificadas como posibles *Pestalotia* sp, estos son hongos endofíticos considerados como saprófitos comunes (Castro, 2003; Kristiansen et al., 2004). Mientras tanto 28 (93,33%), se identificaron como hongos potencialmente micorrízicos. Del total de hongos que presentaron características como posibles *Rhizoctonia*, 26 (92,85%) fueron identificados como potencialmente *Tulasnella* y 2 (7,14%) como posibles *Ceratobasidium*, estos resultados se pueden ver en la Tabla 9.

Tabla 9. Identificación macroscópica y microscópica de los hongos potencialmente micorrízicos.


#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
1	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(8AR)1-PDA			Coloración del micelio: Blanca- Crema (madurar). Descripción Macroscópica: Colonia grande ligeramente algodonosa de color blanco en la parte superior y marrón en la parte inferior, Descripción Microscópica: Hifas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	Género probable: <i>Tulasnella</i>
2	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(8AR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanco- Crema (madurar). Descripción Macroscópica: Colonia grande ligeramente algodonosa, de color blanco en la parte superior y crema en la parte inferior. Descripción Microscópica: Hifas septadas, con ramificaciones con ángulos en 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>
3	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(10B)1M1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción macroscópica: Colonia grande, blanca semi-algodonosa, con crecimiento ramificado. Descripción Microscópica: Hifas largas y septadas, formando ramificaciones en ángulos de 45° y 90°. (Na-monrug <i>et al</i> , 2016).	<i>Tulasnella</i>

#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
4	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(10BR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanca- Crema (madurar). Descripción Macroscópica: Hongo algodonoso de color blanco, presenta una colonia grande con bordes definidos y la presencia de anillos. Crecimiento radial. Descripción Microscópica: Hifas septadas con ramificaciones en ángulos de 45°.	<i>Tulasnella</i>
5	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(10C)1M1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Hongo esponjoso/algodonoso de color blanco en la parte superior y crema en la parte inferior. Descripción Microscópica: Hifas septadas, formando ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>
6	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(10C)3M2-PDA			Coloración del micelio: Blanca- Marrón (madurar). Descripción Macroscópica: Hongo esponjoso de color blanco en la parte superior y marrón en la parte inferior, con crecimiento ramificado, con bordes definidos. Descripción Microscópica: Fusión de hifas largas, septadas y gruesas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>

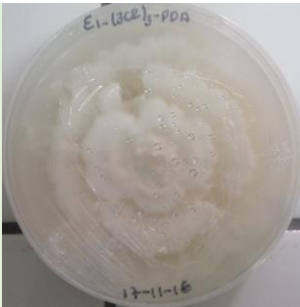



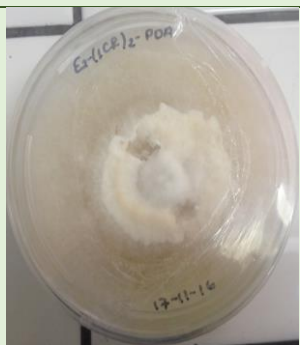

#	ORQUÍDEA- CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
7	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(10CR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanco- Crema (madurar). Descripción Macroscópica: Colonia grande ligeramente algodonosa de color blanco en la parte superior y crema en la parte inferior. Descripción Microscópica: Hifas hialinas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>
8	Especie: <i>Odontoglossum hallii</i> Código: OH-(10C)2M3-PDA			Coloración del micelio: Blanco- Marrón (madurar). Descripción Macroscópica: Colonia grande ligeramente algodonosa de color blanco y en la parte central marrón, presenta crecimiento radial con bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45°.	<i>Tulasnella</i>
9	Especie: <i>Odontoglossum Pardinum</i> Código: OP-(1AR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande blanca algodonosa. Microscópica: Hifas largas, septadas, ramificadas.	Patógeno-no identificado



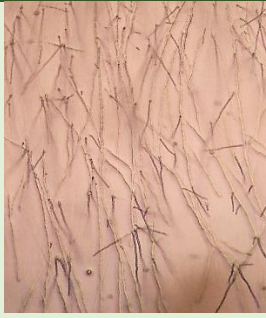
#	ORQUÍDEA- CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
10	Especie: <i>Odontoglossum</i> <i>Pardinum</i> Código: OP-(8AR)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande blanca algodonosa en forma de roseta de crecimiento radial, con bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas y ramificadas.	<i>Pestalotia sp.</i>
11	Especie: <i>Odontoglossum</i> <i>Pardinum</i> Código: OP-(1AR)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de coloración blanca, con crecimiento radial y presencia de bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas largas, septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°. Formación de células monilioides.	<i>Ceratobasidium</i>
12	Especie: <i>Odontoglossum</i> <i>Pardinum</i> Código: OP-(6C)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco- Marrón (madurar). Descripción Macroscópica: Colonia grande blanca algodonosa. Descripción Microscópica: Hifas septadas con ángulos de 45° y 90°. Indicios de células monilioides.	<i>Ceratobasidium</i>

#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
13	Especie: <i>Cyrtorchilum macranthum</i> Código: CM-(2AR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanca. Descripción Macroscópica: Colonia grande blanca semi-algodonosa, con ramificaciones y presencia de bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>
14	Especie: <i>Cyrtorchilum macranthum</i> Código: CM-(7B)1M4-PDA			Coloración del micelio: Blanca- Marrón. Descripción Macroscópica: Colonia grande ligeramente algodonosa de color blanca en la parte superior y marrón en la parte inferior, con crecimiento radial y con bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°. (Barnett y Hunter, 2003).	<i>Tulasnella</i>
15	Especie: <i>Cyrtorchilum macranthum</i> Código: CM-(2BR)1M1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande ligeramente algodonosa de coloración blanco. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45°. (Na-monrug <i>et al</i> , 2016).	<i>Tulasnella</i>

#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
16	Género: <i>Epidendrum sp1.</i> Código: E1-(4AR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande semi-algodonosa de coloración blanca. Descripción Microscópica: Hifas largas y septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>
17	Género: <i>Epidendrum sp1.</i> Código: E1-(8CR)2M1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de coloración blanco. Descripción Microscópica: Hifas hialinas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°. (Na-monrug <i>et al</i> , 2016).	<i>Tulasnella</i>
18	Género: <i>Epidendrum sp1.</i> Código: E1-(4A)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande ligeramente algodonosa de coloración blanca. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45°. (Na-monrug <i>et al</i> , 2016).	<i>Tulasnella</i>

#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
19	Género: <i>Epidendrum sp1.</i> Código: E1-(4A)1M2-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande blanca ligeramente algodonosa, con crecimiento ramificado. Descripción Microscópica: Hifas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°. (Na-monrug <i>et al</i> , 2016).	<i>Tulasnella</i>
20	Género: <i>Epidendrum sp1.</i> Código: E1-(3CR)3M1-PDA			Coloración del micelio: Blanco Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de coloración blanca, en forma de roseta de crecimiento radial y con bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas hialinas largas, septadas, con ramificaciones en ángulos de 45°.	<i>Tulasnella</i>
21	Género: <i>Epidendrum sp1.</i> Código: E1-(10CR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de coloración blanco. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>

#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
22	Género: <i>Epidendrum sp1.</i> Código: E1-(3CR)3-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande blanca algodonosa de crecimiento radial en forma de roseta, con bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas hialinas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>
23	Género: <i>Epidendrum sp2.</i> Código: E2-(10B)1M1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de coloración blanca. Descripción Microscópica: Hifas largas, septadas, con ramificaciones en ángulos de 45°.	<i>Tulasnella</i>
24	Género: <i>Epidendrum sp2.</i> Código: E2-(1CR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanca- Marrón (madurar). Descripción Macroscópica: Colonia grande blanca algodonosa, con bordes definidos. Crecimiento radial. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>

#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
25	Especie: <i>Pleurothallis</i> sp. Código: PS-(5AR)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia pequeña, blanca semi-algodonosa. Descripción Microscópica: Hifas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° (Na-monrug <i>et al</i> , 2016).	<i>Tulasnella</i>
26	Especie: <i>Pleurothallis</i> sp. Código: PS-(5B)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de coloración blanca, con crecimiento radial. Descripción Microscópica: Hifas largas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45°.	<i>Tulasnella</i>
27	Especie: <i>Pleurothallis</i> sp. Código: PS-(10B)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de color blanco en la parte superior y marrón en la parte inferior, presenta forma de roseta, con crecimiento radial y bordes definidos. Descripción Microscópica: Hifas largas, septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i> .

#	ORQUÍDEA-CÓDIGO	COLONIA MEDIO PDA	MICROCULTIVO (LENTE 40x)	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS	IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS POTENCIALMENTE MICORRÍZICAS
28	Especie: <i>Pleurothallis</i> sp. Código: PS-(1CR)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de coloración blanca, con crecimiento radial. Descripción Microscópica: Hifas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45°.	<i>Tulasnella</i>
29	Especie: <i>Pleurothallis</i> sp. Código: PS-(9CR)2-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande semi-algodonosa de color blanco en la parte superior y marrón en la parte inferior. Descripción Microscópica: Hifas septadas, con ramificaciones en ángulos de 45° y 90°.	<i>Tulasnella</i>
30	Especie: <i>Pleurothallis</i> sp. Código: PS-(10CR)1-PDA			Coloración del micelio: Blanco. Descripción Macroscópica: Colonia grande algodonosa de color blanco en la parte superior y marrón en la parte inferior, con crecimiento radial. Descripción Microscópica: Hifas septadas, con ramificaciones en ángulos de 90°.	<i>Tulasnella</i>




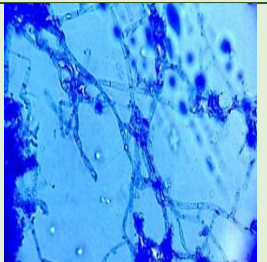


Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

4.4. Identificación de las colonias de hongos contaminantes.

En la Tabla 10, se presenta los resultados de los hongos contaminantes que se analizaron basándose en observaciones micro y macroscópicas, tomando como referencia claves taxonómicas propuestas por Samson *et al*, (1981); Hoyos y Rodríguez (2013).

Los hongos identificados del género *Penicillium*, *Cladosporium* y *Aspergillus* son considerados como microorganismo claves de la microbiota del suelo y contaminantes ambientales presentes en partículas de polvo (Whitelaw, 2000; Vilena y Gutierrez, 2003; Wakelin *et al.*, 2004).

Tabla 10. Identificación macroscópica y microscópica de los hongos descartados y contaminados.

Observación macroscópica	Observación microscópica (lente 10x)	Características	Posible hongo
		Descripción Macroscópica: Micelio color gris poco pigmentada, con textura lisa. Microscópica. Formación de cadenas largas.	<i>Cladosporium</i> sp
		Descripción Macroscópica: Micelio color grisácea, con una textura de granulosa Microscópica. Micelio septado, ramificado, forma de su vesícula, alargada.	<i>Aspergillus</i> sp
		Descripción Macroscópica: Micelio color verde intenso, formando conglomerados irregulares. Descripción Microscópica: Presencia de conidias circulares.	<i>Penicillium</i> sp.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se aislaron hongos potencialmente micorrízicos a partir de raíces jóvenes de seis especies de orquídeas epífitas. Estudios han corroborado que la mayor colonización de hongos micorrízicos se presentan en raíces jóvenes, debido a que la planta en sus primeras etapas de desarrollo, necesita la viabilidad de hongos micorrízicos presente en este tipo de raíces, para absorber de manera más eficiente el agua, asimilar ciertos nutrientes indispensables y carbohidratos libres para su crecimiento (Elsen *et al.*, 2001; Brundrett, 2002).

Las raíces de orquídeas se colectaron en una zona fría en el sector de San Pedro de Yumate, a una altura ente los 3.000 a 3100 m.s.n.m, en este tipo de clima se presentó un porcentaje alto de posibles cajas con colonización micorrízica. Igualmente, en el estudio realizado por Beltrán (2010), determina que la mayor colonización micorrízica se presenta en zonas frías y húmedas.

De las especies de orquídeas con las que trabajamos, de acuerdo a nuestros resultados hay una alta colonización de hongos micorrízicos, esta cuantiosa colonización tiene sentido pues las especies de orquídeas son epífitas, dado que tienen problemas al conseguir agua, nutrientes, irradiación, etc, necesitan alguna contribución simbiote, que en este caso son los hongos micorrízicos (Dearnaley *et al.*, 2012; Martos *et al.*, 2012). Dentro de esa amplia diversidad, se observa que estos hongos aislados posiblemente correspondan al género *Rhizoctonia* y sus órdenes, principalmente *Ceratobasidium* y *Tulasnella*.

Se obtuvieron 26 replantes como posibles *Tulasnella*, estas especies son frecuentemente encontradas en interacción con orquídeas epífitas, tal como lo describe Rivas *et al.* (1998); Arditti y Ghani (2000) y Yuan *et al.*, (2009), por lo que podría ser el principal linaje de hongos que forman una simbiosis de micorrizas con orquídeas (Suárez *et al.*, 2006; Martos *et al.*, 2012; McCormick *et al.*, 2013 Guzmán y Moreno, 2014). A pesar que el número de hongos aislados creemos que es alto y a ciencia cierta no podemos determinar si son especies distintas, el número podría ser aún más alto, dado que muchos hongos son difíciles de aislar, como lo dicen Yuan *et al.*, (2009), en su publicación. Mientras tanto 2 especies se caracterizaron como

potenciales *Ceratobasidium*, en concordancia con el estudio de Guzmán y Moreno (2014), fueron encontrados en *Odontoglossum pardinum*, muestreadas en dos zonas pertenecientes al macizo del cajas y de gran similitud altitudinal con nuestro estudio; además la caracterizaron fue realizada en orquídeas epifitas, por lo cual podemos decir, que presenta una alta preferencia por esta especie de orquídea. De acuerdo al análisis por medio de claves morfológicas, las colonias aisladas podrían no corresponder a *Sebacina*, dado que la frecuencia en raíces de orquídeas en ecosistemas andinos de nuestro país es muy baja (Guzmán y Moreno 2014; Suarez *et al.*, 2016). Por lo que debería ser confirmado por medio de análisis de biología molecular.

Las especies de orquídeas utilizadas en nuestro estudio *Epidendrum* sp1, *Odontoglossum hallii* y *Pleurothallis* sp, obtuvieron el mayor porcentaje de cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos, resultados similares fueron obtenidos en la investigación realizada por Hoyos y Rodríguez (2013), los cuales analizaron especies *Epidendrum nocturnum* y *Pleurothallis* sp, encontraron colonias de hongos correspondientes a *Rhizoctonia*, además son conocidas como las más abundantes en nuestro país, encontrándose en diferentes altitudes. De la especie *Odontoglossum hallii*, hemos encontrado una densa colonización de hongos potencialmente micorrízicos, por lo que esta información puede ser de gran importancia, debido a que no se han encontrado estudios publicados de aislamientos de hongos micorrízicos presentes en esta especie, en las zonas alto andinas del Ecuador.

A partir de raíces de las especies *Odontoglossum pardinum*, *Cyrtorchilum macranthum* y *Epidendrum* sp2 se obtuvieron el menor porcentaje de cajas con colonias de hongos potencialmente micorrízicos. Es posible que la baja colonización de la especie *Cyrtorchilum macranthum*, sea porque no se encuentra en su hábitat normal, que corresponde a altitudes entre los 200-2400 m.s.n.m, (Espinoza, 2010; Cruz y Cárdenas, 2012), siendo sus partes vegetales más susceptibles a daños, lo que puede ocasionar su muerte, siendo de gran dificultad el aislamiento en medios de cultivo (Espinoza, 2010). Con respecto a la especie *Odontoglossum pardinum*, Guzmán y Moreno (2014), demuestran que en zonas alto andinas, al igual que en nuestro estudio posee una preferencia por *Ceratobasidium*, siendo menor la abundancia que aquellas que tienen favoritismo por el género *Tulasnella*.

En las especies *Epidendrum* sp1 y *Epidendrum* sp2, la primera presentó una amplia colonización, mientras que en la segunda la colonización fue baja. Según Beltrán (2010), esto puede ser debido a que algunas orquídeas epífitas presentan densa colonización y mientras que otras no, a pesar que se encuentran en la misma planta y con mayor razón si son diferentes especies. Además, las raíces de la primera especie el procesamiento se realizó el mismo día, mientras que la segunda se procesó el día siguiente, lo que puede ser un factor importante en la disminución de colonias.

En el análisis de las secciones de la raíz la mayor colonización se obtuvo en la zona apical, seguida de la zona basal y por último la zona media. En estudio realizados por Matsumata *et al.*, (2009), se observaron que toda la colonización se dio en la zona apical, mientras que la zona basal y media no tuvo colonización de hongos micorrízicos. En contraste, nuestro estudio si presenta colonización en estas dos zonas, pudiendo ser debido a que el sitio de muestreo es considerado como poco intervenido por el hombre. También, se evidencia que los porcentajes de cada sección no difieren mucho, ya que el muestreo fue realizado en plantas que presentaban características similares en cuanto a su etapa de desarrollo, para evitar desviaciones debido a la edad de la planta.

En el análisis de hongos contaminantes, se identificaron varios tipos de hongos como es el caso de *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp y *Pestalotia* sp. Se demostró en este estudio la diversidad de hongos endófitos asociados a las raíces de orquídeas epífitas. Estos son microorganismos, muchos de ellos son reportados como patógenos, descomponedores de materia orgánica o simplemente como hospederos de las plantas. Para disminuir la contaminación con estos microorganismos, se puede aplicar el método utilizado por Suárez (2006), que se fundamenta en la remoción del velamen y esterilización de las partes externas de las raíces.

La contaminación presente en medio FIM y PDA es mayor en comparación con las dos tesis también desarrolladas en el Orquideario y que forman parte del proyecto “*Estudio de la relación simbiótica orquídea-micorriza en la provincia del Azuay, Ecuador*”, debido a que en nuestra determinación fueron descartadas ciertas cajas de hongos que no presentaban características morfológicas como potenciales *Rhizoctonia* de acuerdo a nuestra bibliografía. Por tal motivo creemos que algunos hongos que fueron

desechados como contaminantes, podrían haber sido del género *Rhizoctonia*. Sin embargo, la separación entre cepas viables y contaminadas, podría haber sido la correcta, ya que al final de nuestro estudio se encontró mayor cantidad de hongos potencialmente micorrízicos y dos colonias que fueron caracterizadas como hongos contaminantes. En contraste con los dos estudios realizados donde se presentó una mayor cantidad de colonias que fueron descartadas por no presentar las características propias de *Rhizoctonia*. En estas investigaciones se incorpora conocimientos en base a la experiencia, además de utilizar una bibliografía diferente.

Las características microscópicas y macroscópicas analizadas en cultivos *in vitro* no siempre resultan ser precisas (Rasmussen, 2002), y en general no permiten determinar grupos establecidos concretos, debido a que los hongos generan similares tipos de hifas, igual coloración, entre otros. Por estas razones se requiere una investigación más específica como un análisis sistemático molecular (Carling et al., 1999; Kristiansen et al., 2001, 2004). Por lo cual, con los hongos potencialmente micorrízicos aislados en esta investigación se realizará la identificación molecular, por medio de secuenciación de la región ITS, esto nos permitirá discriminar cuales corresponden a *Tulasnella* y *Ceratobasidium*, y en base de estos resultados se pueden utilizar estos hongos para futuras investigaciones como son ensayos de germinación *invitro*, en presencia del hongo. Siendo de relevancia ya que se puede aplicar para reinserción de las orquídeas a su hábitat.

4. CONCLUSIONES

La metodología descrita por Zettler, ha sido la apropiada para el aislamiento y mantenimiento de las colonias de hongos potencialmente micorrízicos. De esta manera se pudo identificar por medio de características microscópicas y macroscópicas como hongos pertenecientes al género *Rhizoctonia*.

En esta investigación se aislaron un total de 28 colonias con hongos potencialmente micorrízicos del género- forma *Rhizoctonia*, presentes en las raíces de *Pleurothallis* sp, *Edipendrum* sp1, *Edipendrum* sp2, *Odontoglossum hallii*, *Cyrtorchilum macranthum* y *Odontoglossum pardinum*.

Los patógenos fueron identificados como *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp y *Pestalotia* sp.

Para la identificación de características micro y macroscópicas, la poca información relacionada a este tipo de investigación, dificulta en gran medida, ya que los estudios realizados anteriormente no se presentan este análisis, en su lugar dan un resultado más concreto por medio de análisis molecular.

El mayor número de hongos potencialmente micorrízicos fueron aislados de las raíces de *Epidendrum* sp, *Odontoglossum hallii* y *Pleurothallis* sp.

La sección apical de la raíz (C), presento el mayor número de aislamientos de hongos potencialmente micorrízicos, respecto a los tres fragmentos de raíces analizados.

5. RECOMENDACIONES

El muestreo es preferible que se realice cuando las orquídeas están en su etapa de floración, de manera que se pueda identificar claramente a la especie que pertenecen.

Para obtener buenos resultados de aislamiento de hongos potencialmente micorrízicos, se debe realizar con raíces jóvenes y sanas.

Para la identificación de asociaciones micorrízicas es preferible realizar la tinción de las raíces y mediante cortes histológicos, se puede observar y reconocer la diversidad fungal presente por medio del microscopio óptico.

En nuestro trabajo de titulación la caracterización fue realizada en cuanto a género, debido a que la identificación morfológica de especies dentro del género- forma *Rhizoctonia* es compleja. Es por esto que se deben realizar análisis mediante técnicas de sistemática molecular, para tener resultados claros del tipo de especies al que corresponden.

La simbiosis entre las orquídeas y los hongos micorrízicos es decisiva en el mantenimiento de esta especie en el medio silvestre, debido a que la orquídea se considera especialista y la desaparición de este tipo de hongos conllevará también a la pérdida de orquídeas. Por lo cual el sostenimiento de los ecosistemas, debe ser crucial si se busca conservar a esta vulnerable y diversa familia.

6. REFERENCIAS

- Agrios, G. (2002). Fitopatología. Academic Press Inc. México, DF. pp 838.
- Arditti, J. y Ghani A.K. (2000). Tansley Review No. 110 Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*. 145: 367-421
- Ávila, I. (2012). Programa de la materia optativa: Biología de la conservación de *Orchidacea I*. Recuperado el 15 de Diciembre de 2016, de bios.biologia.unich.mx. Mexico.
- Barea, J. M. y Jeffries, P. (1995). Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. In "Mycorrhiza, structure, function, Molecular Biology and Biotechnology". Pp 521-560. Springer Verlag. Berlin Heidelberg.
- Barrer, S. E. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. Cuenca. Accedido el 3 de julio, 2016, desde <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14.pdf>
- Barnett, H. y Hunter, B. (2003). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minesota: Prentice-Hall.
- Banks, D. P. (2006). Cultivo de orquídeas, propagacion y variedades "Orchids at home". *Biologia Vegetal*. Universidad de Barcelona. Australia. Pp 8-18.
- Bayman, P. y Otero, J. T. (2010). Microbial endophytes of orchid roots: Diversity and effects on plants. In B. Schulz, C. Boyle, and T. Sieber (Eds.). *Microbial root endophytes*. *Soil biology* 9, pp. 153–178. Springer- Verlag, Berlin, Germany.
- Beltrán, M. (2010). Aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres del género *Bletia* (Orchidaceae) en la reserva Natural Barranca del Cupatitzio, Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. , Michoacán, México.
- Blanco, F. y Salas, E. (1996). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. X Congreso nacional agronómico/II Congreso de suelos. Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional. Costa Rica. p. 69
- Bougoure, J. J., Bougoure, D. S., Cairney, J. W. G. y Dearnaley, J. D. W. (2005). ITS-RFLP and sequence analysis of endophytes from *Acianthus*, *Caladenia* and

- Ptostylis (OPrchidaceae) in southeastern Queen Island. *Mycol Res.* 109:452-460.
- Bussmann, R. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista Peruana de Biología* 12:203-216.
- Brundrett, M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320, 37–77
- Cañedo, V. (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú, 62p.
- Cárdenas, N. y Cruz, A. (2012). Colección de germoplasma de especies de la Familia Orchidaceae del cantón Santiago de Méndez- Morona Santiago. Tesis en Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito.
- Carling, D., Pope, E., Brainard, K. y Carter, D. (1999). Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopath.* 64: 492-496.
- Castillo, C. (2005). Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agro-forestales del centro sur de Chile. Tesis PhD. D. Temuco, CL. Universidad de la Frontera, Chile. 124 p.
- Castro, S. N. (2003). Ocurrencia de *Pestalotia* sp. Causando lesiones necróticas en Jazmín de cabo (*Gardenia augustas*) en corrientes argentina, Universidad Nacional del Nordeste. (En línea). Consultado 10 de feb 2017. Disponible en <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/05-Agrarias/A-019.pdf>
- Coyne, M. (2000). Microbiología del suelo un enfoque exploratorio. Editorial Paraninfo ITP An Internacional Thomson Publishing Company. Madrid-España. 416 p.
- CITES, (2013). Apéndices I, II y III de la CITES. Recuperado el día 11 de septiembre de 2016 de <http://www.cites.org/esp/app/in-dex.php>.
- CITES, (2010). Listados Actualizados de las Especies de Fauna y Flora. Recuperado el día 03 de enero de 2017 de [http://www.caftadr.environment.org/spanish/outreach/publications/CITES%20Updated%20Fauna%20and%20Flora%20Species%20\(Spanish\).pdf](http://www.caftadr.environment.org/spanish/outreach/publications/CITES%20Updated%20Fauna%20and%20Flora%20Species%20(Spanish).pdf).
- Crespo, A. P. y Ortega, M. (2015). Aislamiento de micorrizas y evaluación de la germinación simbiótica de las semillas de las orquídeas en el orquideario de la



Universidad de Cuenca. Accedido el 1 de julio, 2016, desde <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/21912/1/TESIS.pdf>

- Cruz, J. (2007). Colonización micorrícica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epífitas tropicales en el Sureste de Chiapas, México. *Tesis de Maestría en Ciencias*. Montecillo, Mexico: Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas.
- Chase, M. W., Freudenstein, J. V. Cameron, K. M. y Barrett, R. L. (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. Pp. 69-89 en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.
- Currah, R. S. (1991) Taxonomic and developmental aspects of the fungal endophytes of terrestrial orchid mycorrhizae. *Lindleyana* 6: 211-213.
- Darwin, C. (2007). La fecundación de las orquídeas. España, Navarra: Laetoli.
- Díaz, G., Azcón-Aguilar, C. y Honrubia, M. (1996). Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant and Soil*. 180, 241-249.
- Díaz, G., Carrillo, C. y Honrubia, M. (2009). Production of *Pinus halepensis* seedlings inoculated with the edible fungus *Lactarius deliciosus* under nursery conditions. *New Forests*. 38, 215-227.
- Díaz, G., Carrillo, C. y Honrubia, M. (2010). Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. *Annals of Forest Science*. 67, 405-413.
- Dodson, C. H. (1991). Orquídeas nativas de Colombia Vol I *Acallis-Dryadella*. Medellín-Colombia.
- Domsch, K., Gams, W. y Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi*. Volume 1. Academic Press, London.
- Dressler, R. L. (2005). How many orchid species. *Selbyana* 26: 155-158
- Elsen, A., Declerk, S., y De Waele, D. (2001). Efecto de tres hongos micorriza arbusculares sobre la infección de *Musa* con el nemátodo nodulador de las raíces (*Meloidogyne* spp). *Infomusa*, 11(1), 21-23.
- Endara, L., Williams, N. H. y León, Y. S. (2010). 1. Explorando los patrones de endemismo de las orquídeas ecuatorianas: Implicaciones para su conservación.X



Congreso Latinoamericano de Botánica. La Serena, Chile.

- Espinoza, J. A. (2010). Recolección de orquídeas en el cantón Zamora Chinchipe y adaptación en el jardín botánico "Reinaldo Espinosa". Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador.
- Fischer, A. (2007). Cultivo de Orquídeas. Buenos Aires: Albatros.
- Freuler, J. M. (2007). Orquídeas. 1 ed. Buenos Aires, Argentina.
- GAD Molleturo (2015). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial. 39-47. SEMPLADES. Ecuador.
- Gil, A. K. (2012). Evaluación del estado de conocimiento y conservación de la familia orchidaceae, a través de colecciones ex situ en el departamento de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Griesbach, R. J. (2002). Development of Phalaenopsis orchids for the mass market. Trends in new crops and new uses. ASHS, Alexandria, USA.
- Guzmán, N. A. y Moreno, B. J. (2014). Efecto de la altitud en la composición y riqueza de hongos Micorrízicos de orquídeas epífitas en bosques montano altos del sur del Ecuador
- Hágsater, E. y Dumont, V. (1996). Orchids. Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland. Hedrén, M. (2001). Conservation priorities in Dactylorhiza, a taxonomically complex genus. Lindleyana 16: 17–25.
- Hermard, C., Ilabaca, C., Jeres, G., Sandoval, P. y Ulloa, A. (2002). Aspectos generales de las Micorrizas: Efecto de las micorrizas sobre la nutrición mineral de las plantas. 10 p. Disponible en: <http://www.forestaluchile.cl/cursos/fivegf/mico>
- Hernández, A. (1999). Las Micorrizas. Centro de estudios ecológicos. Argentina. Disponible en: <http://www.cdeea.com/micorrizas1.htm>
- Hoang, N., Kane, M., Radcliffe, N. R., Zettler, L., y Richardson, L. (2016). Comparative Seed Germination and Seedling Development of the Ghost Orchid, *Dendrophylax Lindenii* (Orchidaceae), and Molecular Identification of Its Mycorrhizal Fungus from South Florida. Rescatado de <https://www.researchgate.net/publication/311947705>
- Hoyos, L. R. y Rodríguez, A. D. (2013). Aislamiento de micorrizas en seis especies de orquídeas nativas de Ecuador para la elaboración de un biofertilizante potencialmente útil en rusticación de orquídeas. Disponible en:

<http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6012/1/UPS-QT04342.pdf>

- Jijón, C. (2007). Jardín botánico de Quito y Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito
- Jijón, C. Y Navarrete, H. (2009). Ecuador País de Orquideas, Provincia de Pichincha-Santo Domingo de los Tsáchilas. Quito
- Jorgensen, P., Ulloa, C. y Maldonado, C. (2006). Riqueza de Plantas Vasculares. Botánica Económica de los Andes Centrales. 37-50.
- Jorgensen, M. y León, Y. (1999). Catálogo de las plantas Vasculares del Ecuador. Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Kristiansen, K. A., Taylor, D. L., Kjoller R., Rasmussen, H. N. y Rosendahl, S. (2001). Identification of mycorrhizal fungi from single pellets of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) using single-strand conformation polymorphism and mitochondrial ribosomal large subunit DNA sequences. Mol. Ecol. 10:2089 - 2093.
- Kristiansen, K. A., Freudenstein J.V., Rasmussen F.N. y Rasmussen, H.N. (2004). Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). Mol. Phylog. Evol. 33:251 - 258.
- Kuan, C. y González, L. (1993). Introducción al cultivo y manejo de las orquídeas. pp 1-16, 47-53, 75-76.
- Matsumata Y., Amira, A. y S. Ito. (2009). Colonization pattern of mycorrhizal fungi associated with two rare orchids, *Cephalanthera falcata* and *C. erecta*. 24: 1023-1031.
- Martos, F., Dulorme, M., Pailler, T., Bonfante, P., Faccio, A., Fournel, J., Dubois, M. P. y Salosse, M. A. (2009). Independent recruitment of saprotrophic fungi as mycorrhizal partners by tropical achlorophyllous orchids. New Phytologist. 184: 668-681.
- Martos, F., Munoz, F., Pailler, T., Kottke, I., Gonneau, C. y SELOSSE, M. A. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. Molecular Ecology, 21(20), 5098-5109.
- Mayo, A., Cazares, J., Lazaro, E. y Flores, A. (2000) Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. Villahermosa. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- McCormick, M. K. y Jacquemyn, H. (2013). What constrains the distribution of orchid

- populations? *New Phytologist*, 202(2), 392-400.
- McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación *In vitro* de semillas de orquídeas. Ceiba. Foundation for Tropical Conservation. Scotland, United Kingdom.
- Moreira, M. A. (1877). Darwin alrededor de las orquídeas.
- Moreira, A. S., Lemos-Filho J. P., Zotz, G. y Isaias R.M. (2009). Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Schltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. *Flora* 204: 604-611.
- Mosquera, A. (2010) Universidad Nacional de Colombia. Colombia. Disponible en: http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/17661.
- Narrea-Cango, M. (2006). Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo). *Revista peruana de entomología*, 45.
- Na-monrug, K., Dixon, K., Chayamarit, S. y Tantiwivat, S. (2016). Using in situ seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium fridericksianum* (Orchidaceae). *Journal of Agriculture and Natural Resources*. 50: 8-13.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D. y Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia* – like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*. 89: 1852-1858.
- Otero, J. T., Thrall, P. H., Clements, M., Burdon, J. J. y Miller, J. T. (2011). Codiversification of orchids (Pterostylidinae) and their associated mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*. 59: 480-497.
- Paillacho, F. (2010). Evaluación de la efectividad de las micorrizas arbusculares nativas sobre el desarrollo y estado nutritivo del palmito (*Bactris gaispaes* HBK) en etapa de vivero, en Santo Domingo de los Tsáchilas. Tesis de ingeniería en ciencias agropecuarias. Santo Domingo de los Tsáchilas – Ecuador.
- Paredes, E. (2012). Determinación de los protocolos para cultivo in-vitro de las especies *Epidendrum schistochilum* y *Oncidium cultratum*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Quito, Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana.
- Prefectura del Azuay. (2015). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del azuay actualizado 2015 - 2030. 80-180.



- Pugo, L. O. (2015). Respuesta Fisiológica de la Orquídea (*Maxillaria grandis*) a la aplicación foliar de biol vacuno. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador. Tesis
- Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244, 149-163.
- Rittershausen, W., Rittershausen, B. y Burgess, L. (2007). Orquídeas. Barcelona: Blume.
- Rivas, M., Warner, J. y Bermúdez, M. (1998). Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Revista de biología tropical*, 46(2), 211-216.
- Rivera, R. A. (2001). Guía ilustrada de 55 especies de orquídeas encontradas en la Reserva Biológica de Yuscarán, Honduras. Zamorano. Honduras. Rescatado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2282/1/IAD-2002-T038.pdf>
- Roberts, P. (1999). Rhizoctonia-forming fungi. The Herbarium, Royal Botanic Gardens, Kew
- Rueda, D. (2004). Módulo Biotecnología Aplicada, Universidad XAMORANO, Carrera de Ciencia Y Producción Agropecuaria, Chile, 2004.
- Samson, R., Hoekstra, E. y Van Oorschot, C. (1981). Introduction to food-borne fungi. Chapter 1.
- Serrano, P. (2007). Germinación de semilla de orquídea (*Cattleya máxima*) mediante propagación in vitro. Tesis de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
- Smith, S. y Read, D. (2008). Mycorrhizal simbiosis. Third Edition. Elsevier.
- Soto, M. A. (1996). México [tratamiento regional]. Pp. 53- 58 en: IUCN/SSC Orchid Specialist Group. Orchids – status survey and conservation action plan. IUCN, Gland y Cambridge.
- Suárez, J. P., Weib, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., y Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological research*, 110(11), 1257-1270.
- Tellez, M., Hernandez, A. y Hernandez, A. (2007). Orquídeas Terrestres de la Sierra Las Navajas. Simposio de biodiversidad y conservación de algunos recursos florísticos en el Estado de Hidalgo, 28. México.

- Tiza, A. G. (2010). Propagación in vitro de las orquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*. Universidad Veracruzana. México.
- UICN. (1996). IUCN Red List of Threatened Animals. Gland, Suiza.
- Valadares, R.B. (2009). Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos asociados à subtribo Oncidiinae. Tesis de Maestría. Escolar Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba Brasil. Pp. 98.
- Valadares, R. B., Pereira, M. C., Otero J. T. y E. J. Cardoso. (2012). Narrow Fungal Mycorrhizal Diversity in a Population of the Orchid *Coppensia doniana*. Biotropica Article first published online: 16 MAR 2011 | DOI: 10.1111/j.1744-7429.2011.00769.x
- Valencia, R., Pitman, N., León, Y. y Jorgensen, M. (2000) Libro Rojo de las Especies Endémicas del Ecuador. Quito: Publicaciones Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Velasco, P. (2007). Manejo comunitario y propuesta de conservación de orquídeas en Peribuela, cantón Cotacachi, provincia de Imbabura. Tesis de Ingeniería en Recursos Naturales Renovables. Universidad Técnica del Norte. Ibarra, Ecuador.
- Vilena, G. y Gutierrez, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Revista Peruana de Biología ISSN 1727-9933 version on-line. 10 (1): 78-87 Recuperado el 14 de febrero de 2017 de http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v10_n1/bio_asper.htm.
- Warcup, J. H. y Talbot, P. H. B. (1967). Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids. New Phytol. 66: 631-641
- Wakelin, S., Rosemary, A., Warren, P. y Harvey, H. (2004). Ryder Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots Biol Fertil Soils 40: 36–43
- Whitelaw, M. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. Adv Agron 69:99–151
- Yuan Z. L., Y.C. Chen, y Yang, Y. (2009). Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. World Journal Microbiology Biotechnolgy 25: 295- 303.



- Zettler, M. L., Schiedek, D. y Bobertz, B. (2007). Benthic biodiversity indices versus salinity gradient in the southern Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, 55:258-270.
- Zettler, L. W. (2013). Seed propagation of the epiphytic green fly orchid *epidendrum conopseum* R. Brown, using its endophytic fungus. Obtenido de The Illinois College.
- Zhu G. S., Yu, Z. N., Gui, Y. y Liu. Z. Y. (2009). A novel technique for isolation orchid mycorrhizal fungi. *Fungal Diversity* 33: 123-137.

7. ANEXOS

Anexo 1.


Medio FIM (fungi Isolation Medium)	
Nitrato de sodio.....0,3 gr	
Cloruro de potasio.....0,1 gr	
Fosfato acido de potasio.....0,2 gr	
Sulfato de magnesio.....0,1 gr	
Extracto de levadura.....0,1 gr	
Azúcar.....2,5 gr	
Agar.....8 gr	
Estreptomicina.....0,5ml	
Agua normal.....1000ml	
Llevar a pH 6,8 Se prepara una solución madre de estreptomicina con 2,67 gr de la misma en 200ml de agua.	

Figura 27. Receta de medio de cultivo FIM.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

Anexo 2.






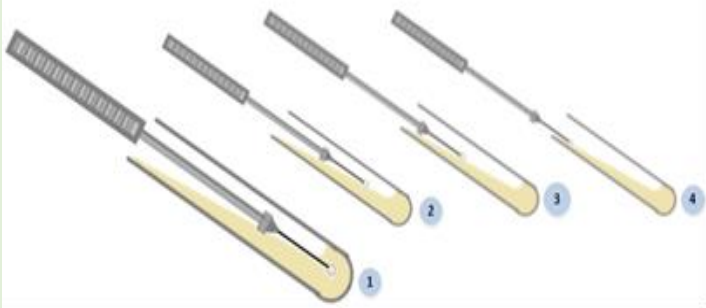

Medio PDA (Agar Dextrosa-Papa)	
Agar.....20gr	
Puré de papa.....10gr	
Glucosa.....20gr	
Agua destilada.....1000ml	
Calibrar pH a 5,6 hervir por un minuto y pasar a los frascos y esterilizar	

Figura 28. Receta de medio de cultivo PDA.

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

Anexo 3.**Tabla 11.** Cultivos de respaldo en tubos de agar inclinado.


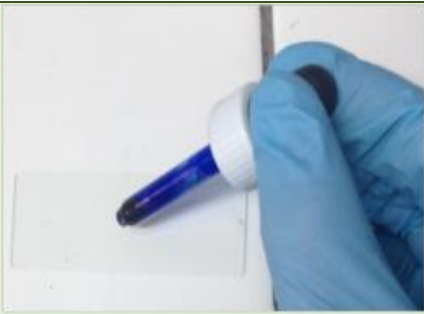
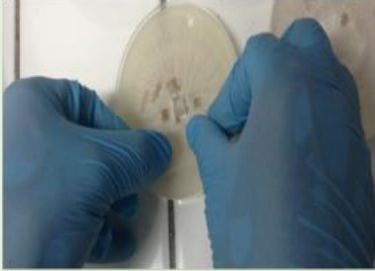
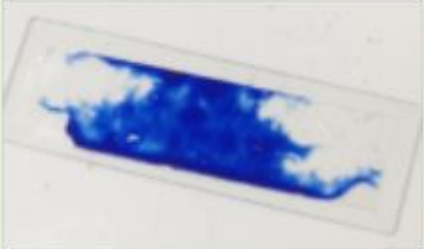
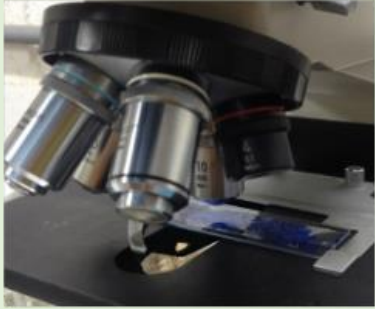
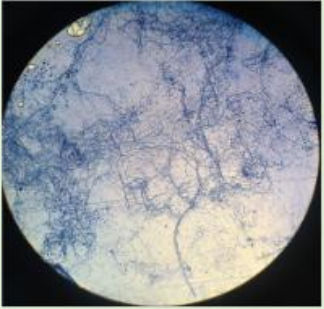
 <p>PASO 1: Verter el medio PDA en los tubos.</p>	 <p>PASO 2: Colocar los tubos en un ángulo para obtener un agar inclinado.</p>
 <p>PASO 3: Esterilizar el asa en el mechero y tomar la porción de muestra con el asa.</p>	 <p>PASO 4: Retirar la tapa y flamear la boca del tubo de ensayo en el mechero.</p>
  <p>PASO 5: Introducir el asa con la muestra en el tubo, a continuación se desliza el asa desde el fondo hacia arriba en forma longitudinal.</p>	

 <p>PASO 6: Finalizada la siembra se flamea y se tapona el tubo. Además se Rotula las claves de identificación.</p>	 <p>PASO 7: Los tubos se los incubaba en una estufa a 25°C hasta la obtención de resultados.</p>
---	---

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

Anexo 4.

Tabla 12. Identificación de hongos contaminados mediante la prueba de la cinta.

 <p>PASO 1: Cortar un pedazo de cinta menor al tamaño de un portaobjetos.</p>	 <p>PASO 2: Colocar una pequeña cantidad de azul de metileno en un portaobjetos.</p>
 <p>PASO 3: Colocar el pedazo de cinta sobre la colonia.</p>	 <p>PASO 4: Pegar la cinta sobre la gota de azul de metileno del portaobjetos.</p>
 <p>PASO 5: Observar la estructura de la colonia al microscopio para su identificación.</p>	 <p>PASO 6: Obtención de resultados.</p>

Elaborado por Blanca León y Santiago Romero

8. GLOSARIO

Anamorfos: Fase conídica, imperfecta o asexual en los ascomicetos y algunos basidiomicetos, en la que se producen conidios.

Axénicas: Un cultivo axénico consiste en una sola especie microbiana, proveniente de una sola célula. Los cultivos axénicos son muy extraños en la naturaleza. En los medios naturales como por ejemplo, en el suelo, agua, o en el cuerpo humano. Existen cultivos mixtos.

Callo: Prominencia o protuberancia dura en el labelo.

Columna: Cuerpo central especializado en la flor de una orquídea, formado por la unión de estambres y pistilos.

Deforestar: Despojar un terreno de plantas forestales.

Embrión: En las plantas fanerógamas, esbozo de la futura planta, contenido en la semilla.

Endémico: Propio y exclusivo de determinadas localidades o regiones.

Endospermo: Tejido del embrión de las plantas fanerógamas, que les sirve de alimento.

Epífita: Planta que crece naturalmente sobre otra planta, pero que no depende de ella para su nutrición u obtención de agua.

Especie: Nivel taxonómico de un grupo de plantas que muestran una interrelación entre sus individuos y una o más características en común, las cuales las separan definitivamente de otros grupos.

Fotosíntesis: Proceso a través del cual, la planta fabrica carbohidratos o azúcar a partir del agua y dióxido de carbono. Este proceso ocurre en las partes verdes de la planta, que poseen clorofila.



Labio, labelo: Pétalo inferior de una flor de orquídea, especializado para ayudar en la polinización de la planta por insectos. Tiene una forma distinta, generalmente más grande, de los otros pétalos de la flor.

Litófita: Planta que crece sobre rocas.

Micorriza: Asociación, generalmente simbiótica, entre la raíz de una planta y determinados hongos.

Monocotiledóneo: Dicho de una planta, que tiene un embrión con un solo cotiledón; p. ej., la palmera.

Nativo: Perteneciente o relativo al país o lugar natal.

Perenne: Que vive más de dos años.

Plántula: Planta joven, al poco tiempo de brotar de la semilla.

Pseudobulbo: Porción engrosada de la parte basal del tallo de muchas orquídeas. Se encarga de almacenar agua y nutrientes.

Polifilético: Perteneciente o relativo a un grupo taxonómico que consiste de miembros que tienen en común una característica que evolucionó separadamente en diferentes lugares del árbol filogenético.

Rizoma: Tallo que crece horizontalmente, en forma indefinida, a partir del cual se forman raíces adventicias, hojas y/o ramas.

Simbiosis: Asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, sobre todo si los simbiosiontes sacan provecho de la vida en común.

Sustrato: Material en el cual se hace crecer una planta; puede ser orgánico, como corteza de árbol, o inorgánico, como piedras de lava.

Testa: Cubierta externa de la semilla.

Tubérculo: Parte de un tallo subterráneo, o de una raíz, que engruesa considerablemente, en cuyas células se acumula una gran cantidad de sustancias de reserva.

Velamen: Tejido que cubre las raíces aéreas de las orquídeas epifíticas, encargado de absorber agua y de evitar la evaporación excesiva de agua desde el tejido radical.